

## 明細書

## 無細胞系タンパク質合成におけるミクロソーム膜添加による翻訳後修飾方法

## 技術分野

本発明は、無細胞系タンパク質合成方法、特に翻訳後修飾が行なわれ得る無細胞系タンパク質合成方法に関する。

## 背景技術

タンパク質の構造や機能を解析する上で、タンパク質の大量生産は不可欠な技術である。しかしながら、大腸菌をはじめとする数多くの生細胞を用いた発現系は、その生物の生命維持に支障となるタンパク質を合成することは事実上困難であり、限られたタンパク質のみの取得・解析しか行われてこなかった。これに対し、無細胞系タンパク質合成は、タンパク質合成に必要な装置のみを取り出した人工的なタンパク質合成に特化した系であるので、生細胞の発現系の抱える問題点を解決し得る手法であると期待されている。

また、ゲノム解析の進展に伴い、生体内に存在するすべてのタンパク質の構造と機能の網羅的な解明をめざしたプロテオーム解析が進行している。生体内のタンパク質は、細胞質に存在する遊離のリボソーム上で翻訳が開始した後、ほぼ例外なく翻訳中あるいは翻訳後にプロテアーゼによるプロセシングや、特定のアミノ酸残基の修飾といった翻訳後修飾を受ける。これらの翻訳後修飾は、多くの場合タンパク質の機能発現やその制御に直接関与することから、これらの解析はタンパク質機能の解明に不可欠である。

一般的な無細胞系タンパク質合成法としては大腸菌溶解液、小麦胚芽抽出液、ウサギ網状赤血球溶解液等が知られているが、高等動物・植物で生じる主要な翻訳後修飾能をもつタンパク質合成系としては、ウサギ網状赤血球溶解液に犬臍臓

ミクロソーム膜を添加した系が既に知られている（犬臍臓ミクロソーム膜については、ウォルター、ピー. とプローベル、ジー. (Walter, P. and Blobel, G.), 「メソッズ エンツアイモロジー (Method Enzymology)」, (米国), 1983年, 第96巻, p. 84-93; ブレイド, エヌ. ジェイ. ら (Bulleid, N. J. et al.), 「ザ バイオケミカル ジャーナル (The Biochemical journal)」, (米国), 1990年, 第268巻, p. 777-781; パラディス, ジー. ら (Paradis, G. et al.), 「バイオケミストリー アンド セル バイオロジー (Biochemistry and cell biology)」, (カナダ国), 1987年, 第65巻, p. 921-924等参照)。しかし、犬臍臓ミクロソーム膜は非常に高価であるため、数多くのタンパク質の網羅的な合成に用いるには不向きであった。これを解決する手段として、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞) から小胞体画分、ゴルジ体画分、細胞膜画分をそれぞれ別々に調製し、ウサギ網状赤血球溶解液に添加する系が開発された（例えば、特開2002-238595号公報参照）。しかしながら翻訳後修飾装置の調製には多くの労力を要するものであった。特殊な装置を用いて、不活性ガス雰囲気下で加圧し、翻訳後修飾活性を有する昆虫由来抽出液を調製する方法が開発された（例えば、特開2000-325076号公報参照）が、mRNAの5' -UTR (非翻訳配列) と目的遺伝子のシグナル配列との組み合わせが修飾の有無を左右するという実際の使用に不向きな点があった。また装置が特殊であることから汎用性に欠けていた。

以上のことから、汎用性が高く、抽出液にあった無細胞系タンパク質合成における翻訳後修飾方法が望まれていた。

## 発明の開示

### 発明の目的

本発明は、上記課題を解決するためになされたものであり、その目的とするところは、無細胞系タンパク質合成における新規な翻訳後修飾方法ならびに当該翻訳後修飾反応を利用した新規な無細胞系タンパク質合成方法を提供することである。

### 発明の概要

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下のとおりである。

(1) 無細胞系タンパク質合成用抽出液を用いる無細胞系でのタンパク質合成方法であって、翻訳反応を節足動物由来のミクロソーム膜の存在下で行うことを含む方法。

(2) mRNA濃度 ( $\mu$  g/m l) と節足動物由来のミクロソーム膜の濃度 (A 260)との比が1:0. 1~5で翻訳反応を行う上記(1)に記載の方法。

(3) 当該比が1:0. 3~2. 3である、上記(2)に記載の方法。

(4) 節足動物由来のミクロソーム膜が昆虫組織から抽出されたものである、上記(1)~(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 昆虫組織がカイコ組織である、上記(4)に記載の方法。

(6) カイコ組織が脂肪体である、上記(5)に記載の方法。

(7) 節足動物由来のミクロソーム膜が昆虫培養細胞から抽出されたものである、上記(1)~(3)のいずれかに記載の方法。

(8) 昆虫培養細胞が *Trichoplusia ni* 卵細胞由来あるいは *Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞由来の培養細胞である、上記(7)に記載の方法。

(9) 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、節足動物由来の抽出物を含有するものである、上記(1)~(3)のいずれかに記載の方法。

(10) 節足動物由来の抽出物が昆虫組織から抽出されたものである、上記(9)

に記載の方法。

- (11) 昆虫組織がカイコ組織である、上記(10)に記載の方法。
- (12) カイコ組織がカイコ幼虫の後部網糸腺を少なくとも含有する、上記(11)に記載の方法。
- (13) 節足動物由来の抽出物が昆虫培養細胞から抽出されたものである、上記(9)に記載の方法。
- (14) 昆虫培養細胞が *Trichoplusia ni* 卵細胞由来あるいは *Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞由来の培養細胞である、上記(13)に記載の方法。
- (15) 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、小麦胚芽由来の抽出物を含有するものである、上記(1)～(3)のいずれかに記載の方法。
- (16) 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、哺乳動物培養細胞由来の抽出物を含有するものである、上記(1)～(3)のいずれかに記載の方法。
- (17) 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、ウサギ網状赤血球由来の抽出物を含有するものである、上記(1)～(3)のいずれかに記載の方法。
- (18) 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、大腸菌由来の抽出物を含有するものである、上記(1)～(3)のいずれかに記載の方法。
- (19) 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、酵母由来の抽出物を含有するものである、上記(1)～(3)のいずれかに記載の方法。
- (20) 無細胞系タンパク質合成用抽出液を用いる無細胞系でのタンパク質合成において、翻訳反応を節足動物由来のミクロソーム膜の存在下で行うことを含む、翻訳後のタンパク質の修飾方法。
- (21) mRNA濃度( $\mu$ g/ml)と節足動物由来のミクロソーム膜の濃度(A260)との比が1:0.1～5で翻訳反応を行う上記(20)記載の方法。
- (22) 当該比が1:0.3～2.3である、上記(21)記載の方法。
- (23) 節足動物由来のミクロソーム膜が昆虫組織から抽出されたものである、

上記（20）～（22）のいずれかに記載の方法。

（24）昆虫組織がカイコ組織である、上記（23）に記載の方法。

（25）カイコ組織が脂肪体である、上記（24）に記載の方法。

（26）節足動物由来のミクロソーム膜が昆虫培養細胞から抽出されたものである、上記（20）～（22）のいずれかに記載の方法。

（27）昆虫培養細胞が*Trichoplusia ni* 卵細胞由来あるいは*Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞由来の培養細胞である、上記（26）に記載の方法。

（28）無細胞系タンパク質合成用抽出液が、節足動物由来の抽出物を含有するものである、上記（20）～（22）のいずれか1項に記載の方法。

（29）節足動物由来の抽出物が昆虫組織から抽出されたものである、上記（28）に記載の方法。

（30）昆虫組織がカイコ組織である、上記（29）に記載の方法。

（31）カイコ組織がカイコ幼虫の後部絹糸腺を少なくとも含有する、上記（30）に記載の方法。

（32）節足動物由来の抽出物が昆虫培養細胞から抽出されたものである、上記（28）に記載の方法。

（33）昆虫培養細胞が*Trichoplusia ni* 卵細胞由来あるいは*Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞由来の培養細胞である、上記（32）に記載の方法。

（34）無細胞系タンパク質合成用抽出液が、小麦胚芽由来の抽出物を含有するものである、上記（20）～（22）のいずれかに記載の方法。

（35）無細胞系タンパク質合成用抽出液が、哺乳動物培養細胞由来の抽出物を含有するものである、上記（20）～（22）のいずれかに記載の方法。

（36）無細胞系タンパク質合成用抽出液が、ウサギ網状赤血球由来の抽出物を含有するものである、上記（20）～（22）のいずれかに記載の方法。

(37) 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、大腸菌由来の抽出物を含有するものである、上記(20)～(22)のいずれかに記載の方法。

(38) 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、酵母由来の抽出物を含有するものである、上記(20)～(22)のいずれかに記載の方法。

(39) 翻訳後のタンパク質の修飾が、N-グリコシル化および／またはシグナル配列の切除である、上記(20)～(22)のいずれかに記載の方法。

(40) 上記(1)～(3)のいずれかに記載のタンパク質合成方法によって得られた、N-グリコシル化されたタンパク質。

(41) 上記(1)～(3)のいずれかに記載のタンパク質合成方法によって得られた、シグナル配列が切除されたタンパク質。

本発明によれば、シグナルペプチドの切断やN-グリコシル化等のタンパク質の翻訳後修飾を行うことが可能な無細胞系タンパク質合成方法を提供することができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、構築した発現プラスミド [in vitro pro-TNF-GLC遺伝子転写用プラスミドーI (I) および in vitro pro-TNF-GLC遺伝子転写用プラスミドーII (II)] の模式図である。

図2は、節足動物由来の抽出物 (カイコ由来 (BML)、High Five 由来 (HFL)、Sf21 (Sf21L) 由来) を含有する無細胞系タンパク質合成用抽出液を用いて、ミクロソーム膜 (犬臍臓由来 (CMM)、High Five 由来 (HFMM)、Sf21 由来 (Sf21MM)) 存在下、あるいは非存在下でタンパク質合成を行い、N-グリコシル化が行われているか否かを調べた結果を示す図である。

図3は、ウサギ網状赤血球溶解液を含有する無細胞系タンパク質合成用抽出液を用いて、ミクロソーム膜 (High Five 由来 (HFMM)、Sf21 由

来 (S<sub>f</sub> 21 MM)) 存在下、あるいは非存在下でタンパク質合成を行い、グリコシル化が行われているか否かを調べた結果を示す図である。

#### 発明を実施するための形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、無細胞系タンパク質合成用抽出液を用いる無細胞系でのタンパク質合成方法であって、翻訳反応を節足動物由来のミクロソーム膜の存在下で行うことと特徴とする。

無細胞系タンパク質合成方法は、通常、翻訳装置としてのリボソームなどを含有する生体由来抽出物を含有する無細胞系タンパク質合成用反応液に、転写録型または翻訳録型を添加して行う。翻訳録型としては、録型DNAから転写して得られたmRNAであってもよい。

本発明に使用される無細胞系タンパク質合成用反応液に含まれる抽出物は、翻訳録型を翻訳して該録型にコードされるタンパク質を生成させ得るものであれば如何なるものであってもよく、従来公知の大腸菌、コムギ、オオムギ、イネ、コーン等のイネ科の植物、及びホウレンソウなど植物種子の胚芽、ウサギ網状赤血球などから抽出された抽出物、抽出液を特に制限なく使用することができる。これらは市販のものを用いることもできるし、それ自体既知の方法、具体的には、大腸菌、小麦胚芽またはウサギ網状赤血球由来の抽出液の場合には、「生物化学実験法43、遺伝子発現研究法」(学会出版センター)に記載の方法等に準じて調製することもできる。市販のタンパク質合成用細胞抽出液としては、大腸菌由来ではRTS100 E. coli HY Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) などが挙げられ、ウサギ網状赤血球由来ではRabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease Treated (プロメガ社製) など、コムギ胚芽由来ではPROTEIOS set (東洋紡績社製) などが挙げられる。さらに酵母由来の抽出液は、Gasiorらの

方法 (Gasior, E. ら、J. Biol. Chem.、254、3965-3969、1979) あるいは Hussain らの方法 (Hussain, I. ら、Gene、46、13-23、1986) に準じて調製することができる。また本発明者らが提案する方法に準じて調製することもできる (特願2003-01317)。

このように本発明の無細胞系タンパク質合成用反応液には、上述のような公知の抽出物、抽出液が含まれていてもよいが、本発明者らが提案してきている節足動物由来の抽出物が含まれているものであってもよい。

ここで「節足動物」とは、後生動物の一門であって、左右相称、裂体腔を有する旧口動物を指し、鉄角亜門、大顎亜門のいずれに属するものであってもよく、たとえば、昆虫綱、クモ綱などに属する動物を包含する。中でも、昆虫綱またはクモ綱 (特に、クモ亜綱) に属する節足動物が好ましく、昆虫綱に属する節足動物が特に好ましい。昆虫綱に属する節足動物としては、たとえば、鱗翅目 (チョウ目)、直翅目、双翅目、膜翅目、鞘翅目、甲虫目、脈翅目、半翅目などに属するものが挙げられ、特に制限されるものではないが、中でも、カイコガ科、ヤガ科などの鱗翅目に属するものが好適に使用される。

本発明における無細胞系タンパク質合成用反応液中に含有される上記節足動物由来の抽出物は、節足動物の成長段階のいずれを問わずいかなる組織から抽出されたものであってもよく、また、節足動物のいずれの組織由来の培養細胞より抽出されたものであってもよい。中でも、カイコ組織または昆虫培養細胞から抽出されたものであるのが特に好ましい。

「カイコ」は、カイコガ科に属する鱗翅目昆虫 (絹糸昆虫) と同義であり、その一生において「卵 (胚)」(産卵直後より孵化直前までの間)、「幼虫」(孵化直後から繭の形成終了直前 (1齢期～5齢期に分けられる))、「蛹」(繭の形成終了直前から羽化する直前までの間)、ならびに「成虫 (蛾)」(羽化直後より死亡までの間) の各状態を経るものであり、その一生にわたる形態のいずれをも含むものと

する。カイコは、卵より孵化した後の幼虫の状態では、桑を食べて発育する期間（齢）と、食べずに脱皮の準備をする期間（眠）を交互に繰り返す。カイコの幼虫において、孵化してから1回目の脱皮までを1齢期、1回目の脱皮から2回目の脱皮までを2齢期といい、通常、4回脱皮して5齢期で成熟する（この成熟した状態のカイコ幼虫は「熟蚕」とも呼ばれる）。カイコの幼虫は、熟蚕になると体が透明になり絹糸を吐いて繭を形成し、蛹化する。蛹の後、羽化して成虫となる。

無細胞系タンパク質合成用反応液がカイコ組織由来の抽出物を含有する場合、組織としてはカイコの一生のうちのどの状態（卵、幼虫（1齢期～5齢期）、蛹、成虫）のいずれの組織であってよい。またカイコ組織は、単一の状態における単一の組織（たとえば、5齢期のカイコ幼虫における後部絹糸腺のみ）に限らず、単一の状態における複数の組織（たとえば、5齢期のカイコ幼虫における後部絹糸腺および脂肪体）であってもよく、複数の状態における単一の組織（たとえば、3齢期、4齢期、5齢期の各カイコ幼虫における後部絹糸腺）であってもよいものとする。無論、複数の状態における複数の組織であってもよい。なおカイコ組織は、カイコ組織の全体（たとえば、後部絹糸腺全体）である必要はない。

ここで、カイコ組織の「絹糸腺」とは、カイコ幼虫の両体側において、頭部の下唇先端に位置する吐出口から盲管にまで連なる一対の管状の外分泌腺であり、前部絹糸腺、中部絹糸腺および後部絹糸腺に大きく分けられる。後部絹糸腺は、絹糸の中心部を為すフィブロインを分泌する。また中部絹糸腺は、セリシンを分泌する。フィブロインは中部絹糸腺に蓄積されるとともに、セリシンによってその外周を覆われて、ゲル状の絹物質となる。この絹物質は、前部絹糸腺を通って吐出口から排出され、固体化して絹糸となる。

またカイコ組織の「脂肪体」とは、カイコ幼虫において、体内の至るところに分布し、白色の柔らかい扁平な帯状、ひも状あるいは葉状の組織である。脂肪体は、ヒトの肝臓に似て栄養、エネルギー源を貯蔵する役目を果たしているので、

細胞内には脂肪球、タンパク質、グリコーゲンその他の新陳代謝に関する種々の物質を含んでいる。

また「胚」は、カイコの卵の状態の組織を指す。

またカイコ組織に由来する抽出物を含有する場合、カイコ幼虫の絹糸腺、脂肪体およびカイコの胚から選ばれる少なくともいずれか由来の抽出物であるのが好ましい。カイコ幼虫の絹糸腺（特に、後部絹糸腺）より調製を行うと、短時間で大量のタンパク質が合成可能であるという特に優れた利点がある。またカイコ幼虫の脂肪体から抽出液を調製すると、脂肪体が柔らかい組織であるために、すり潰す作業が短時間で済み、結果として容易に抽出液を調製できる利点がある。さらに、カイコの胚から調製を行うと、胚が1つの個体であるために他の組織とは異なり摘出する作業を要さず、結果として容易に抽出液を調製できるという利点がある。

カイコを抽出対象とする場合、カイコは1齢期～5齢期の幼虫であればよいが、5齢期のカイコ幼虫が好ましい。これは、カイコ幼虫は繭の形成期に近づくにつれて組織が成熟し、特に5齢期のカイコ幼虫においては組織が1齢期～5齢期のうちで最も成熟しているため、同量の抽出物を得るために要する数は少なくて済むためである。中でも、5齢期のカイコ幼虫の絹糸腺または脂肪体（好ましくは5齢期のカイコ幼虫の後部絹糸腺、より好ましくは5齢期の3日～7日のカイコ幼虫の後部絹糸腺）からの抽出物を含有すると、他の齢期のものと比べて短時間で大量のタンパク質が合成可能な無細胞系タンパク質合成用反応液が得られるという利点もあり、特に好ましい。

また、上述したように無細胞系タンパク質合成用反応液に含有される節足動物由来の抽出物は、従来公知の節足動物を由来とする培養細胞から得られたものであってもよい。かかる培養細胞としては、培養細胞株が多く樹立されており、また、多くの哺乳類系の培養細胞と異なり二酸化炭素雰囲気下での培養を必要とせず、無血清培地においても培養が可能であることから、鱗翅目、半翅目などの昆

虫由来の培養細胞（昆虫培養細胞）を使用するのが好ましい。昆虫培養細胞も、いかなる組織由来の細胞であってもよく、たとえば、血球細胞、生殖巣由来細胞、脂肪体由来細胞、胚由来細胞、孵化幼虫由来細胞などを特に制限なく使用することができるが、中でも、タンパク質生産能が高いと考えられる生殖巣由来の昆虫培養細胞を使用するのが好ましい。特には、細胞系においてタンパク質合成能が高く、また無血清培地にて培養が可能である、*Trichoplusia ni* の卵細胞由来の細胞 High Five (Invitrogen社製) や *Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞由来の細胞 Sf 21 (Invitrogen社製) が好適な昆虫培養細胞として例示される。

上記節足動物由来の抽出物を含有する無細胞系タンパク質合成用反応液は、従来公知の適宜の組成の抽出用液を用いて、節足動物の組織または培養細胞より抽出操作を行って得られた抽出液（無細胞系タンパク質合成用抽出液；抽出液＝抽出用液+抽出物）を調製し、これに後述するような翻訳反応に要する成分、場合によっては翻訳反応および転写反応に要する成分を適宜添加することで、調製することができる。

節足動物からの抽出操作に用いられる抽出用液としては、特には制限されるものではないが、プロテアーゼインヒビターを少なくとも含有するのが好ましい。プロテアーゼインヒビターを含有する抽出用液を用いると、節足動物由来の抽出物に含有されるプロテアーゼの活性が阻害され、当該プロテアーゼによる抽出物中の活性タンパクの不所望な分解を防止でき、結果として節足動物由来の抽出物が有するタンパク質合成能を有効に引き出すことができるようになるという利点がある。上記プロテアーゼインヒビターとしては、プロテアーゼの活性を阻害し得るものであるならば特に制限はなく、たとえば、フェニルメタンスルホニルフルオリド（以下、「PMSF」ということがある。）、アプロチニン、ベスタチン、ロイペプチニン、ペプスタチンA、E-64 (L-trans-エポキシスクニルロイシルアミド-4-グアニジノブタン)、エチレンジアミン四酢酸、ホスホラ

ミドンなどを使用することができるが、節足動物由来の抽出物にはセリンプロテアーゼが含まれることが多いことから、上記中でもセリンプロテアーゼに対して特異性の高いインヒビターとして働くPMSFを使用するのが好ましい。また、1種類のプロテアーゼインヒビターのみならず、数種類の混合物（プロテアーゼインヒビターカクテル）を用いてもよい。

当該抽出用液中におけるプロテアーゼインヒビターの含有量に特に制限はないが、無細胞系タンパク質合成に必須な酵素類の分解阻害能を好適に発揮できる観点から、1 μM～50 mM含有されることが好ましく、0.01 mM～5 mM含有されることがより好ましい。プロテアーゼインヒビターが1 μM未満であると、プロテアーゼの分解活性を充分抑えることができない傾向にあるためであり、またプロテアーゼインヒビターが50 mMを越えると、タンパク質合成反応を阻害する傾向にあるためである。

また本発明に用いる抽出用液は、上記プロテアーゼインヒビターに加えて、カリウム塩、マグネシウム塩、DTTおよび緩衝剤を少なくとも含有するのが好ましい。

上記カリウム塩としては、たとえば酢酸カリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム、塩化カリウム、リン酸水素二カリウム、クエン酸水素二カリウム、硫酸カリウム、リン酸二水素カリウム、ヨウ化カリウム、フタル酸カリウムなど一般的な形態で使用することができ、中でも酢酸カリウムを使用するのが好ましい。カリウム塩は、タンパク質合成反応における補助因子として作用する。

当該抽出用液中におけるカリウム塩の含有量に特に制限はないが、保存安定性の観点から、たとえば酢酸カリウムなど1価のカリウム塩である場合、10 mM～500 mM含有されることが好ましく、50 mM～300 mM含有されることがより好ましい。カリウム塩が10 mM未満または500 mMを越えると、タンパク質合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

上記マグネシウム塩としては、たとえば酢酸マグネシウム、硫酸マグネシウム

、塩化マグネシウム、クエン酸マグネシウム、リン酸水素マグネシウム、ヨウ化マグネシウム、乳酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、シウウ酸マグネシウムなど一般的な形態で使用することができ、中でも酢酸マグネシウムを使用するのが好ましい。マグネシウム塩も、タンパク質合成反応における補助因子として作用する。

当該抽出用液中におけるマグネシウム塩の含有量に特に制限はないが、保存安定性の観点から、たとえば酢酸マグネシウムなど2価の塩である場合、0. 1 mM～10 mM含有されることが好ましく、0. 5 mM～5 mM含有されることがより好ましい。マグネシウム塩が0. 1 mM未満または10 mMを越えると、タンパク質の合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

上記D T Tは、酸化防止の目的で配合されるものであり、当該抽出用液中において0. 1 mM～10 mM含有されることが好ましく、0. 5 mM～5 mM含有されることがより好ましい。D T Tが0. 1 mM未満または10 mMを越えると、タンパク質の合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

上記緩衝剤は、抽出用液に緩衝能を付与し、たとえば酸性または塩基性物質の添加などによって起こる抽出液のpHの急激な変化による抽出物の変性を防止する目的で配合される。このような緩衝剤としては特に制限はなく、たとえば、HEPES-KOH、Tris-HCl、酢酸-酢酸ナトリウム、クエン酸-クエン酸ナトリウム、リン酸、ホウ酸、MES、PIPESなどを使用することができる。

緩衝剤は、得られた抽出液のpHが4～10に保持されるようなものを使用するのが好ましく、pHが6. 5～8. 5に保持されるようなものを使用するのがより好ましい。抽出液のpHが4未満またはpHが10を越えると、本発明の反応に必須な成分が変性する虞があるためである。このような観点より、上記中でもHEPES-KOH (pH 6. 5～8. 5) を使用するのが特に好ましい。

当該抽出用液中における緩衝剤の含有量に特に制限はないが、好適な緩衝能を

保持する観点から、5 mM～200 mM含有されることが好ましく、10 mM～100 mM含有されることがより好ましい。緩衝剤が5 mM未満であると、酸性または塩基性物質の添加によりpHの急激な変動を引き起こし、抽出物が変性する傾向にあるためであり、また緩衝剤が200 mMを越えると、塩濃度が高くなり過ぎ、タンパク質合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

また抽出対象である節足動物が昆虫培養細胞である場合、上記組成に加えて、塩化カルシウムおよびグリセロールをさらに含有してなる抽出用液を用いると、タンパク質合成能がより向上された昆虫培養細胞抽出液を得ることができるために好ましい。

この場合、塩化カルシウムの含有量は特に制限されないが、上記タンパク質合成能の向上の効果を有効に発揮し得る観点より、0.1 mM～10 mMであるのが好ましく、0.5 mM～5 mMであるのがより好ましい。また、グリセロールの添加量についても特に制限されるものではないが、上記タンパク質合成能の向上の効果を有効に発揮し得る観点より、5 (v/v) %～80 (v/v) %となるように添加されるのが好ましく、10 (v/v) %～50 (v/v) %となるように添加されるのがより好ましい。

節足動物の組織または培養細胞より抽出液を抽出する方法についても特に制限はなく、従来公知の適宜の方法にて行うことができる。

たとえば、節足動物由来の抽出物として、カイコ組織由来の抽出物または昆虫培養細胞由来の抽出物を使用する場合、上述したような組成の抽出用液を使用して、本発明者らが提案している抽出方法にて抽出液を調製するのが、好適である。

以下、それぞれの場合について詳述する。

#### [A] カイコ組織由来の抽出物を含有する抽出液の調製方法

まず、常法にしたがって、たとえばハサミ、ピンセット、メスなどの器具を使用して、カイコより所望の組織を摘出する。この摘出によって得る後述の抽出に

使用する組織量としては、特に制限はないが、通常、1 g～100 gの範囲内である。

次に、摘出した組織を、たとえば液体窒素で凍結した後、-80°Cで凍結させた乳鉢中ですり潰し、これに上述した抽出用液を添加して抽出操作を行う。

あるいは、上記抽出用液の添加後、一旦抽出用液も凍結させた後、シャーベット状になるまで（具体的には、ウェットな黄色いシャリシャリ状態の氷になるまで）、薬さじで攪拌しながら溶解する。その後、再度液体窒素で完全に凍結させた後、シャーベット状になるまで（具体的には、ウェットな黄色いシャリシャリ状態の氷になるまで）薬さじで攪拌しながら溶解させる。かかる方法によれば、タンパク質合成に関与する成分が効率的に抽出され且つ安定化されるという利点がある。

このようにして、まず、カイコの組織からの抽出物を含有する液状物を得る。

次に、上記抽出処理で得られた液状物を遠心分離にかける。該遠心分離は、当分野において通常行われている条件（10,000×g～50,000×g、0°C～10°C、10分間～60分間）で行う。該遠心分離を1回行った後の上清（上清A1）をそのまま用いて抽出液とするようにしてもよいし、また、該上清A1に上記と同様の条件にて再度の遠心分離を行い、得られた上清（上清A2）を抽出液としてもよい。

また、上記上清A1と、上記1回目の遠心分離後の沈殿から上記抽出用液を用いてさらに抽出を行った後に、上記と同様の条件にて遠心分離して得られた上清（上清A3）とを混合して、抽出液として調製するようにしてもよい。このように上清A1と上清A3とを混合して抽出液を調製することで、上清A1、上清A3を単独で抽出液とする場合と比較して、タンパク質合成効率が向上するという利点がある。またさらに、上清A2を、上清A3と混合して抽出液を調製してもよい。これにより上記効果はさらに増強される。勿論、上記上清A1～上清A3を混合して、抽出液を調製するようにしてもよい。

この場合、調製される混合物（抽出液）における上清A 1 および／または上清A 2（両方混合する場合には、その総量）と上清A 3との混合割合に特に制限はないが、タンパク質の合成効率の観点からは、体積比で10：90～90：10であるのが好ましく、20：80～80：20であるのがより好ましい。

なお上述のようにそれぞれ調製した後に、ゲル濾過を施し、ゲル濾過後の濾液より280 nmにおける吸光度が最も高い画分付近を分取して抽出液として調製するようにしてもよい。しかしながらタンパク質の合成効率の観点からは、当該ゲル濾過および画分の分取を経ずに抽出液として調製するのが好ましい。

なお、上記ゲル濾過を施し、ゲル濾過後の濾液より280 nmにおける吸光度が最も高い画分付近を分取する場合には、具体的には以下の手順にて行えばよい。

たとえば脱塩カラム PD-10（アマシャムバイオサイエンス社製）を使用し、常法にしたがって、ゲル濾過用緩衝液にてカラムを平衡化した後、試料を供給し、上記抽出用液にて溶出する、というような条件にて行う。上記ゲル濾過用緩衝液は、上記抽出用液に、グリセロールをさらに添加したものであることが好ましい。グリセロールは、通常、5 (v/v) %～40 (v/v) %（好ましくは、20 (v/v) %）となるように添加すればよい。ゲル濾過して得られる濾液は、通常のゲル濾過で行われているように、0. 1 mL～1 mLを1画分とすればよく、高いタンパク質合成能を有する画分を効率よく分取するという観点より、0. 4 mL～0. 6 mLを1画分とするのが好ましい。

次に、ゲル濾過後の濾液より280 nmにおける吸光度が10以上の画分を分取する。当該処理は、たとえばUltraviolet 3300 pro（アマシャムバイオサイエンス社製）などの機器を用いて、各画分について上記280 nmにおける吸光度を測定し、この吸光度が最も高い画分付近を分取し、これを抽出液とする。

#### 〔B〕昆虫培養細胞由来の抽出物を含有する抽出液の調製方法

昆虫培養細胞から抽出液を調製する場合、本発明者らが提案する、抽出用液中に懸濁した昆虫培養細胞を急激に凍結させる工程を少なくとも含有する方法によって調製するのが好ましい。ここで「急激に凍結」とは、凍結処理に付した後10秒以下、好ましくは2秒以下にて、昆虫培養細胞を凍結させることを指す。また昆虫培養細胞を急激に凍結させる温度としては、通常-80°C以下であり、好ましくは-150°C以下である。上記昆虫培養細胞の急激な凍結は、たとえば、液体窒素や液体ヘリウムなどの不活性ガスを使用することなどによって実現できるが、入手が容易であり安価な液体窒素を用いて行うのが好ましい。

かかる方法によって昆虫培養細胞からの抽出を行うことにより、緩和な状態で細胞の破碎を行うことができ、無細胞系タンパク質合成に必須な成分を破壊することなく細胞外に取り出すことができ、従来よりもタンパク質の合成量の高い無細胞系タンパク質合成用抽出液を容易に調製することができる。さらに、使用器具などからのRNaseなどの混入も防ぐことができ、また、界面活性剤などの試薬を用いた細胞破碎法の場合に懸念される翻訳反応を阻害するような物質の持込みもない。

上記本発明者らが提案する抽出液の調製方法では、上述した急激に凍結させる工程を少なくとも含有しているならば、その他の工程について特に制限はない。たとえば、乳鉢中で乳棒を用いてすり潰す方法、ダウンスホモジナイザーを用いる方法、ガラスピーブを用いる方法など、大腸菌や小麦胚芽などから無細胞系タンパク質合成用抽出液を得る際に従来行われていた種々の手法にて昆虫培養細胞を破碎し、抽出を行えばよい。中でも、上記昆虫培養細胞を急激に凍結させた後、解凍し、遠心分離することによって昆虫培養細胞を破碎するのが好ましい。

上記急激に凍結した昆虫培養細胞を、解凍した後、遠心分離する場合、解凍は、たとえば-10°C~20°Cの水浴または氷水浴中での解凍、室温(25°C)にての放置などによって実現できるが、タンパク質合成に必須な成分の失活を防止し、タンパク質合成能の低下を確実に防ぐことから、0°C~20°C(特には、4

°C～10°C) の水浴または氷水浴中で解凍を行うのが好ましい。解凍した昆虫培養細胞の遠心分離は、当分野において通常行われている条件 (10,000×g～50,000×g、0°C～10°C、10分間～60分間) で行えばよい。かかる遠心分離後の上清には、目的とする昆虫培養細胞の抽出物が含有される。

細胞破碎後、上記遠心分離後の上清 (上清B1) をそのまま抽出液としてもよいし、上清B1をさらに遠心分離 (10,000×g～100,000×g、0°C～10°C、10分間～120分間) にかけて、得られた上清 (上清B2) を抽出液としてもよい。さらに、上記上清B1または上清B2をゲル濾過し、ゲル濾過後の濾液より280nmにおける吸光度が10以上の画分 (吸収の大きな画分) を分取して、これを抽出液としてもよい。この場合、具体的には以下の手順にて行う。

まず、上清B1または上清B2についてゲル濾過を行うが、ゲル濾過は、たとえば脱塩カラム PD-10 (アマシャム バイオサイエンス社製) を好適に使用することができ、常法にしたがって、ゲル濾過用緩衝液にてカラムを平衡化した後、試料を供給し、上記ゲル濾過用緩衝液にて溶出する、というような条件にて行えばよい。上記ゲル濾過用緩衝液としては、従来公知の適宜の組成のものを特に制限なく使用することができ、たとえば、10mM～100mMのHEPE-S-KOH (pH 6.5～8.5)、50mM～300mMの酢酸カリウム、0.5mM～5mMの酢酸マグネシウム、0.5mM～5mMのDTT、0.01mM～5mMのPMSFを含有するゲル濾過用緩衝液を用いることができる。ゲル濾過して得られる濾液は、通常のゲル濾過で行われているように、0.1mL～1mLを1画分とすればよく、高いタンパク質合成能を有する画分を効率よく分取するという観点より、0.4mL～0.6mLを1画分とするのが好ましい。

続いて、たとえばUltralab 3300 pro (アマシャム バイオサイエンス社製) などの機器を用いて、280nmにおける吸光度が30以上の画分 (吸収の大きな画分) をゲル濾過後の濾液より分取して、これを抽出液とする

また上記ゲルfiltrationで得られた吸収の大きな画分を、さらに遠心分離にかけて、得られた上清（上清B 3）を抽出液とするようにしてもよい。このゲルfiltration後の遠心分離は、翻訳反応を阻害する不溶性の成分を除去するという理由から、30,000×g～100,000×g、0℃～10℃、10分間～60分間の条件で行うのが、好ましい。

なお、本発明の調製方法に供する昆虫培養細胞は、培養に用いる培地の翻訳反応液への持込みを避けるため、上記急激な凍結を行う前に、プロテアーゼインヒビターおよびグリセロールを含有しない以外は、上述した昆虫培養細胞用の好適な抽出用液と同じ組成の洗浄液にて予め洗浄しておくのが好ましい。洗浄液での洗浄は、昆虫培養細胞に洗浄液を添加し、これを遠心分離（たとえば、700×g、10分間、4℃という条件）することによって行う。洗浄に用いる洗浄液の量は、培地を完全に洗い流すという理由から、湿重量1gの昆虫培養細胞に対し5mL～100mLであるのが好ましく、10mL～50mLであるのがより好ましい。洗浄回数は、1回～5回行うのが好ましく、2回～4回行うのがより好ましい。

本発明の抽出液中における節足動物由来の抽出物の含有量に特に制限はないが、タンパク質濃度で1mg/mL～200mg/mLであるのが好ましく、中でも10mg/mL～100mg/mLであるのがより好ましい。当該抽出物の含有量がタンパク質濃度で1mg/mL未満であると、無細胞系タンパク質合成に必須な成分の濃度が低くなり、充分な合成反応が行えなくなる虞があるためであり、また当該抽出物の含有量がタンパク質濃度で200mg/mLを越えると、抽出液自体が高い粘性を有し、操作しづらい虞があるためである。

なお上記範囲の量の節足動物由来の抽出物を含有する抽出液は、抽出液のタンパク質濃度測定を利用して、調製できる。当該タンパク質濃度測定は、当分野において通常行われているように、たとえばBCA Protein assay

Kit (P I E R C E 社製) を使用し、反応試薬 2 mL に対してサンプルを 0. 1 mL 加え、37°Cで 30 分間反応させ、562 nmにおける吸光度を測定する、といった手順によって行う。分光光度計 (U l t r a s p e c 3300 pro、アマシャム バイオサイエンス社製) を用いて、562 nmにおける吸光度を測定する。コントロールとしては、通常、ウシ血清アルブミン (B S A) を使用する。

無細胞系タンパク質合成方法においては、たとえば上述したようにして調製された抽出液を用いて、翻訳系用反応液または転写／翻訳系用反応液を調製する。翻訳系用反応液、転写／翻訳系用反応液のいずれの場合であっても、上記抽出液を 10 (v/v) %～80 (v/v) %、特には 30 (v/v) %～60 (v/v) % 含有するように調製されたものであるのが好ましい。すなわち、反応液の全体において、節足動物由来の抽出物の含有量が、タンパク質濃度で 0. 1 mg /mL～160 mg /mL となるように調製されるのが好ましく、3 mg /mL～60 mg /mL となるように調製されるのがより好ましい。当該抽出物の含有量がタンパク質濃度で 0. 1 mg /mL 未満または 160 mg /mL を越えると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

以下、節足動物由来の抽出物を含有する抽出液を用いた場合を例にとって (1) 翻訳系用反応液、(2) 転写／翻訳系用反応液について、それぞれ説明する。節足動物由来の抽出物以外の抽出物を含有する抽出液を用いた場合には、その由来に応じて必要な試薬や反応条件が適宜設定される。

#### (1) 翻訳系用反応液

翻訳系用反応液は、上記節足動物由来抽出液を除く成分として、翻訳錆型、カリウム塩、マグネシウム塩、D T T、アデノシン三リン酸、グアノシン三リン酸、クレアチニン酸、クレアチンキナーゼ、アミノ酸成分、R N a s e インヒター、t R N A、緩衝剤を少なくとも含有するのが好ましく、本発明の目的である、タンパク質の翻訳後修飾の為には、ミクロソーム膜、より具体的には後述す

る節足動物由来のミクロソーム膜を含む。かかる翻訳系用反応液を使用して翻訳系合成反応を行うことで、短時間で大量のタンパク質の合成が可能である。

翻訳系用反応液に含める翻訳錠型（mRNA）は、その塩基数に特に制限はなく、目的とするタンパク質を合成し得るならばmRNA全てが同じ塩基数でなくともよい。また、目的とするタンパク質を合成し得る程度に相同な配列であれば、各mRNAは、複数個の塩基が欠失、置換、挿入または付加されたものであってよい。mRNAは、従来公知の適宜の方法にて錠型DNA（その調製は例えば後述の通り）を転写して調製することができるが、自体公知のインビトロ転写によって錠型DNAを転写し、調製するのが好ましい。インビトロ転写は、たとえばRibomax Large Scale RNA production System-T7（プロメガ社製）などを利用して行うことができる。mRNAは、転写後、自体公知の方法にて精製して単離し、後述するように無細胞系タンパク質合成用の翻訳錠型として、翻訳系用反応液に適用することができる。

翻訳系用反応液中において、翻訳錠型は、タンパク質合成の速度の観点から、 $1 \mu\text{g/mL} \sim 2000 \mu\text{g/mL}$ 含有されることが好ましく、 $10 \mu\text{g/mL} \sim 1000 \mu\text{g/mL}$ 含有されることがより好ましい。mRNAが $1 \mu\text{g/mL}$ 未満または $2000 \mu\text{g/mL}$ を越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

翻訳系用反応液中において、節足動物由来のミクロソーム膜は、タンパク質の翻訳後の修飾効率の観点から、 $260 \text{ nm}$ の吸光度（以降A260）で $1 \sim 50$ （ $A260 = 1 \sim 50$ ）、好ましくは $2 \sim 15$ （ $A260 = 2 \sim 15$ ）含有される。ミクロソーム膜がA260で1未満では、翻訳後修飾が充分に行われない傾向にあり、50を越えるとタンパク質合成自体を顕著に阻害する傾向にあるためである。さらに、翻訳反応液中においてmRNA濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ）と節足動物由来のミクロソーム膜濃度（A260）との比が $1 : 0.1 \sim 5$ 、好ましくは $0.3 \sim 2.3$ であることがタンパク質の翻訳後修飾効率の観点からいっそう好まし

い。

mRNA濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) と節足動物由来のミクロソーム膜の濃度 (A260) との比を求める際の節足動物由来のミクロソーム膜の純度は、通常 A260/A280 = 1.3~2.0 で、好ましくは 1.4~1.8 のものである。該比が 1:0.1~5 (好ましくは 0.3~2.3) とは、反応液 1 mL 中に mRNA が 1  $\mu\text{g}$  存在する場合にミクロソーム膜の濃度が A260 で 0.1~5 (好ましくは 0.3~2.3) であることを意味する。

当該ミクロソーム膜は翻訳開始時に反応液中に存在していることが好ましいが、所望により適宜その添加時期を調節してもよい。

節足動物由来のミクロソーム膜としては、昆虫組織 (特にカイコ組織)、昆虫培養細胞 (特に *Trichoplusia ni* 卵細胞、*Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞) 由来であって、ミクロソーム膜の活性が失われない方法であれば特にその調製方法は限定されないが、例えば基本的には Waller, P と Blobel, G の方法 (Enzymol. 96, pp. 84-93, 1983 年) の方法を基に、ショ糖密度勾配による超遠心分離にて調製することができる。すなわち、昆虫組織、あるいは遠心分離により集めた昆虫培養細胞を 1 gあたり 1~10 mL のミクロソーム膜抽出用液 (抽出液の組成は用いる組織や細胞の種類に応じて適宜変更し得る) に懸濁し、その後、ホモジナイザー (好ましくはダウンスホモジナイザー) 処理にて細胞を破碎する。破碎後遠心分離等により細胞残渣を取り除き上清を回収する。回収した上清からシュクロース密度勾配による超遠心分離でミクロソーム膜画分を分離する。より詳細な調製方法は実施例に後述する。

翻訳系用反応液中におけるカリウム塩としては、抽出用液の成分として上述した各種のカリウム塩、好適には酢酸カリウム、を好ましく使用できる。カリウム塩は、上述した抽出用液におけるカリウム塩の場合と同様の観点から、当該翻訳系用反応液中において、10 mM~500 mM 含有されることが好ましく、50

mM～150mM含有されることがより好ましい。

翻訳系用反応液中におけるマグネシウム塩としては、抽出用液の成分として上述した各種のマグネシウム塩、好適には酢酸マグネシウム、を好ましく使用できる。マグネシウム塩は、上述した抽出用液におけるマグネシウム塩の場合と同様の観点から、当該翻訳系用反応液中において、0.1mM～10mM含有されることが好ましく、0.5mM～3mM含有されることがより好ましい。

翻訳系用反応液中におけるDTTは、上述した抽出用液におけるDTTの場合と同様の観点から、0.1mM～10mM含有されることが好ましく、0.2mM～5mM含有されることがより好ましい。

翻訳系用反応液中におけるアデノシン三リン酸（以下、「ATP」ということがある。）は、タンパク質合成の速度の観点から、0.01mM～10mM含有されることが好ましく、0.1mM～5mM含有されることがより好ましい。ATPが0.01mM未満または10mMを越えると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

翻訳系用反応液中におけるグアノシン三リン酸（以下、「GTP」ということがある。）は、タンパク質合成の速度の観点から、0.01mM～10mM含有されることが好ましく、0.1mM～5mM含有されることがより好ましい。GTPが0.01mM未満または10mMを越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

翻訳系用反応液中におけるクレアチニンリン酸は、タンパク質を継続的に合成するための成分であって、ATPとGTPを再生する目的で配合される。クレアチニンリン酸は、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において1mM～200mM含有されることが好ましく、10mM～100mM含有されることがより好ましい。クレアチニンリン酸が1mM未満であると、充分な量のATPとGTPが再生されにくく、結果としてタンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためであり、またクレアチニンリン酸が200mMを越えると、阻害物質として働く

き、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

翻訳系用反応液中におけるクレアチンキナーゼは、タンパク質を継続的に合成するための成分であって、クレアチンリン酸と共にATPとGTPを再生する目的で配合される。クレアチンキナーゼは、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ ～ $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$ 含有されることが好ましく、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ ～ $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 含有されることがより好ましい。クレアチンキナーゼが $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 未満であると、充分な量のATPとGTPが再生されにくく、結果としてタンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためであり、またクレアチンキナーゼが $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$ を越えると、阻害物質として働き、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

翻訳系用反応液中におけるアミノ酸成分は、20種類のアミノ酸、すなわち、バリン、メチオニン、グルタミン酸、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、グリシン、プロリン、イソロイシン、トリプトファン、アスパラギン、セリン、トレオニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、チロシン、リシン、グルタミン、シスチン、アルギニン、の20種類のアミノ酸を少なくとも含有する。このアミノ酸には、ラジオアイソトープ標識されたアミノ酸も含まれる。さらに、必要に応じて、修飾アミノ酸を含有していてもよい。当該アミノ酸成分は、通常、各種類のアミノ酸を概ね等量ずつ含有してなる。

本発明においては、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において上記のアミノ酸成分が $1\text{ }\mu\text{M}$ ～ $1000\text{ }\mu\text{M}$ 含有されることが好ましく、 $10\text{ }\mu\text{M}$ ～ $200\text{ }\mu\text{M}$ 含有されることがより好ましい。アミノ酸成分が $1\text{ }\mu\text{M}$ 未満または $1000\text{ }\mu\text{M}$ を越えると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

翻訳系用反応液中におけるRNaseインヒビターは、抽出液に混在する節足動物由来のRNaseによって、無細胞系タンパク質合成の際にmRNAやtRNAが不所望に消化されて、タンパク質の合成を妨げるのを防ぐ目的で配合され

るものであり、当該反応液中において0.1U/μL～100U/μL含有されることが好ましく、1U/μL～10U/μL含有されることがより好ましい。RNaseインヒビターが0.1U/μL未満であると、RNaseの分解活性を充分抑えることができない傾向にあるためであり、またRNaseインヒビターが100U/μLを越えると、タンパク質合成反応を阻害する傾向にあるためである。

翻訳系用反応液中におけるtRNAは、上記20種類のアミノ酸に対応した種類のtRNAを概ね等量ずつ含有してなる。本発明においては、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において1μg/mL～1000μg/mL含有されることが好ましく、10μg/mL～500μg/mL含有されることがより好ましい。tRNAが1μg/mL未満または1000μg/mLを越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

翻訳系用反応液に含有される緩衝剤としては、上述した抽出用液に用いたものと同様のものが好適に使用でき、同様の理由から、HEPES-KOH (pH 6～8) を使用するのが好ましい。また、緩衝剤は、上述した抽出用液における緩衝剤の場合と同様の観点から、5mM～200mM含有されることが好ましく、10mM～50mM含有されることがより好ましい。

また翻訳系用反応液は、さらにグリセロールを添加されたものであるのがより好ましい。グリセロールを添加すると、翻訳系合成反応においてタンパク質合成に必須な成分を安定化できるという利点があるためである。グリセロールを添加する場合、通常、5(v/v)%～20(v/v)%となるように添加する。

さらに、翻訳系用反応液は、エチレングリコールビス(2-アミノエチルエーテル)四酢酸(以下、「EGTA」ということがある。)を含有するのが好ましい。EGTAを含有すると、EGTAが抽出液中の金属イオンとキレートを形成することでリボヌクレアーゼ、プロテアーゼなどを不活化させることにより、無細胞系タンパク質合成に必須な成分の分解を阻害することができるためである。該

EGTAは、上記反応液中において、上記分解阻害能を好適に発揮し得る観点から0.01 mM～10 mM含有されることが好ましく、0.1 mM～5 mM含有されることがより好ましい。EGTAが0.01 mM未満であると必須な成分の分解活性を充分に抑えることができない傾向にあるためであり、また、10 mMを越えるとタンパク質合成反応を阻害する傾向にあるためである。

すなわち、翻訳系用反応液としては、節足動物由来抽出物を含有する抽出液を30 (v/v) %～60 (v/v) %含有するとともに、50 mM～150 mMの酢酸カリウム、0.5 mM～3 mMの酢酸マグネシウム、0.2 mM～5 mMのDTT、5 (v/v) %～20 (v/v) %のグリセロール、0.1 mM～5 mMのATP、0.1 mM～5 mMのGTP、10 mM～100 mMのクレアチニン酸、10  $\mu$ g/mL～500  $\mu$ g/mLのクレアチニンキナーゼ、10  $\mu$ M～200  $\mu$ Mのアミノ酸成分、1 U/ $\mu$ L～10 U/ $\mu$ LのRNaseインヒター、10  $\mu$ g/mL～500  $\mu$ g/mLのtRNA、10  $\mu$ g/mL～100  $\mu$ g/mLの翻訳錠型、翻訳系反応液中、A260で1～50の哺乳動物ミクロソーム膜（翻訳錠型との濃度比は、mRNA ( $\mu$ g/mL) : ミクロソーム膜濃度 (A260) = 1 : 0.1～5）、10 mM～50 mMのHEPES-KOH (pH 6～8) を含有するように実現されるのが好ましい。

また、上記に加えてさらに0.1 mM～5 mMのEGTAを含有するように実現されるのがより好ましい。

上記翻訳系用反応液を用いた無細胞系タンパク質合成反応（翻訳系合成反応）は、従来公知のたとえば低温恒温槽にて行う。反応温度は、通常、10°C～40°C、好ましくは20°C～30°Cの範囲内である。反応温度が10°C未満であると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあり、また反応温度が40°Cを越えると、必須な成分が変性する傾向にあるためである。反応の時間は、通常、1時間～72時間、好ましくは3時間～24時間である。

## （2）転写／翻訳系用反応液

転写／翻訳系用反応液は、上記抽出液を除く成分として、転写録型、RNAポリメラーゼ、ATP、GTP、シチジン5'-三リン酸、ウリジン5'-三リン酸、クレアチニンリン酸、クレアチニンキナーゼ、アミノ酸成分およびtRNAを少なくとも含有するのが好ましく、本発明の目的である、タンパク質の翻訳後修飾の為には、ミクロソーム膜、より具体的には節足動物由来のミクロソーム膜を含む。かかる転写／翻訳系用反応液を使用して転写／翻訳系合成反応を行うことで、短時間で大量のタンパク質の合成が可能である。

なお転写録型（録型DNA）は、プロモーター配列およびタンパク質をコードする構造遺伝子を少なくとも有するものであれば、いかなる塩基配列、塩基数のものであってもよい。構造遺伝子がコードするタンパク質（ペプチドを含む）に特に制限はなく、生細胞で細胞毒となるタンパク質をコードする塩基配列を有するものであってもよいし、また糖タンパク質をコードする塩基配列を有するものであってもよい。録型DNAにおいて、通常、プロモーター配列は構造遺伝子の5'上流側に配置される。プロモーター配列としては、たとえば、従来公知のT7プロモーター配列、SP6プロモーター配列、T3プロモーター配列などが挙げられる。

また、本発明の録型DNAは、構造遺伝子の3'下流側にターミネーター配列を有するのが好ましい。上記ターミネーター配列としては、たとえば、従来公知のT7ターミネーター配列、SP6ターミネーター配列、T3ターミネーター配列などが挙げられる。また、録型DNAは、合成されたmRNAの安定性などの観点から、構造遺伝子の3'下流側にポリA配列を有していてもよい。

当該録型DNAは、(1)予め複数の領域に分割された録型DNAをライゲーションする工程と、(2)ライゲーション後のDNAをPCRによって増幅させる工程とを少なくとも含有する方法によって、合成されたものであってもよい。ここで、領域の数は、一連のライゲーション反応とその後のPCRによってつなぎ合わせて増幅させることができ領域は2つであり、さらに別の領域をつなぎ合わ

せて増幅させるためには、さらに一連のライゲーションとPCRを行わなければならぬいため、可能な限り少ない領域に分割されたものであるのが好ましい。該領域数は、2個～5個であるのが好ましく、2個～3個であるのがより好ましく、2個であるのが特に好ましい。鑄型DNAは、当該鑄型DNAにおいて領域内にない塩基配列部分や、各領域において互いに重複する塩基配列部分が増幅されないように、換言すれば、全ての領域をつなぎ合わせると鑄型DNAとなるよう預め分割される。分割された各領域は、プラスミドDNAより制限酵素にて切断し調製したDNAであってもよいし、PCRによって増幅させたDNAであってもよいし、DNA合成機にて合成したDNAであってもよい。

まず、鑄型DNAを預め分割した領域のうち、互いに隣り合う領域をライゲーションさせる。ライゲーション反応を行う際には、預め、DNAの末端を、両方のDNAが順方向で連結できるようなかたちに調製しておくとよい。具体的には、つなぎ合わせたい2つのDNAの末端を平滑末端に調製しておく。あるいは、同じ制限酵素で切断した断片としておく。また、片方のDNAの末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼによってリン酸化しておき、効率よくライゲーション可能な状態に調製しておくとよい。ライゲーションの際に用いる試薬や反応条件は、当分野にて通常実施されているように行えばよい。たとえば、NEB社製Quick Ligation Kitを用い、プロトコルに従い、DNA、反応バッファー、Quick T4 Ligaseを混合し、25°Cにて5分間インキュベーションすればよい。

次に、上記ライゲーション後のDNAをPCRによって増幅させる。PCRは、市販のPCR用サーマルサイクラーなど、従来公知の装置を特に制限なく使用して行うことができる。PCRの条件に特に制限はなく、当分野において通常行われている条件にて行えばよい。例えば、東洋紡績社製KOD plusを用い、そのプロトコルに従えばよい。この際用いるプライマーは、増幅させたいDNAの端部の配列をもとに作製したセンスプライマーとアンチセンスプライマーを

用いる。これにより、ライゲーションにより多種類のつなぎ合わされたDNAが生じるが、PCRによって所望のDNAのみが増幅される。

さらに、鑄型DNAが3つ以上の領域に分かれる場合は、上述のPCRで増幅したDNAとさらにつなぎ合わせたいDNAを用い、ライゲーション、PCRを行い、鑄型DNAを調製する。

また、本発明における鑄型DNAは、翻訳反応促進活性を有する配列（以下、「翻訳反応促進配列」ということがある。）をさらに有するのが好ましい。ここで「翻訳反応促進配列」とは、この翻訳反応促進配列を有する鑄型DNAを使用して無細胞系タンパク質合成反応を行うことで、この翻訳反応促進配列を有しない鑄型DNAを使用して無細胞系タンパク質合成反応を行った場合と比較して、翻訳効率が1.2倍以上（好適には、2倍以上）に向上される配列を指す。

かかる翻訳反応促進活性配列としては、上記のような翻訳反応促進活性を有する公知の配列を適宜使用することができ、特に制限されるものではない。翻訳反応促進活性配列の具体的な例としては、カイコまたはバキュロウイルスにおける5' 非翻訳領域（5' UTR）として公知の塩基配列である。具体的には、カイコのフィブロインL鎖遺伝子の5' UTRの塩基配列、カイコのセリシン遺伝子の5' UTRの塩基配列、AcNPV (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) のポリヘドリン遺伝子の5' UTRの塩基配列、BmCPV (*Bombyx mori cytoplasmin polyhedrosis virus*) のポリヘドリン遺伝子の5' UTRの塩基配列、EsCPV (*Euxoa scandens cytoplasmin polyhedrosis virus*) のポリヘドリン遺伝子の5' UTRの塩基配列、HcNPV (*Hyphantria cunea nuclear polyhedrosis virus*) のポリヘドリン遺伝子の5' UTRの塩基配列、CrNPV (*Choristoneura rosaceana nucleopolyhedrovirus*) のポリ

ヘドリン遺伝子の5'UTRの塩基配列、EoNPV (*Ecotropis oblique nuclear polyhedrosis virus*) のポリヘドリン遺伝子の5'UTRの塩基配列、MnNPV (*Malacosma neustria nucleopolyhedrovirus*) のポリヘドリン遺伝子の5'UTRの塩基配列、SfNPV (*Spodoptera frugiperda nucleopolyhedrovirus*) のポリヘドリン遺伝子の5'UTRの塩基配列、WsNPV (*Wiseana signata nucleopolyhedrovirus*) のポリヘドリン遺伝子の5'UTRの塩基配列等が挙げられる。これらの翻訳反応促進配列は、従来公知のいかなる方法により得られてもよい。たとえば、公知のDNA合成機を用いて合成することができる。

上記翻訳反応促進配列は、鑄型DNAにおいて、上記構造遺伝子の5'上流側に1または複数個組み込まれてなるのが好ましい。翻訳反応促進配列は、構造遺伝子の5'上流側において、順方向(5'→3')に組み込まれてもよいし、逆方向(3'→5')に組み込まれてもよい。また、2個以上の翻訳反応促進配列が組み込まれたものであってもよく、その場合、組み込まれた翻訳反応促進配列は同じものであっても互いに異なるものであってもよい。また、2個以上の翻訳反応促進配列が組み込まれた場合、全ての翻訳反応促進配列が同じ方向に組み込まれていなくともよい。翻訳反応促進配列は、構造遺伝子の5'上流側において、構造遺伝子に隣り合うように組み込まれてもよいし、構造遺伝子との間に1塩基以上の塩基配列を介在させた状態で組み込まれてもよい。

さらに、当該鑄型には上述した配列以外に、所望の配列を導入してもよい。具体的には、翻訳後修飾を受けたタンパク質を精製して以降の実験等に用いる場合は好適な配列を導入することができる。例えば、電気泳動に付与する前のSDS化を容易にするため精製を行うことが好ましい場合がある。ニッケルカラム等による精製を行う場合には、当該鑄型DNAにHis-tagを付加する。

転写録型は、転写／翻訳系用反応液中において、0. 1  $\mu$  g/mL ~ 8000  $\mu$  g/mL 含有されることが好ましく、3  $\mu$  g/mL ~ 600  $\mu$  g/mL 含有されることがより好ましい。転写録型が0. 1  $\mu$  g/mL 未満または8000  $\mu$  g/mL を越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液中において、節足動物由来のミクロソーム膜は、タンパク質の翻訳後の修飾効率の観点から、A260で1~50 (A260=1~50)、好ましくは2~15 (A260=2~15) 含有される。ミクロソーム膜がA260で1未満では、翻訳後修飾が充分に行なわれない傾向にあり、50を越えるとタンパク質合成自体を顕著に阻害する傾向にあるためである。さらに、翻訳反応液中においてmRNA濃度 ( $\mu$  g/mL) と哺乳動物由来のミクロソーム膜の濃度 (A260) 比が1:0. 1~5、好ましくは0. 3~2. 3であることがタンパク質の翻訳後の修飾効率の観点からいっそう好ましい。

節足動物由来ミクロソーム膜としては、上記翻訳系用反応液で用いたものと同様なものが、同様な調製方法にて利用できる。

転写／翻訳系用反応液に用いるRNAポリメラーゼは、転写録型が有するプロモーター配列に応じて適宜選択することができる。たとえば、転写録型がT7プロモーター配列を有している場合は、その配列を認識するT7 RNAポリメラーゼを使用することが好ましい。また転写録型が、SP6またはT3プロモーター配列を有している場合は、それぞれ、SP6 RNAポリメラーゼまたはT3 RNAポリメラーゼを使用することが好ましい。

RNAポリメラーゼは、mRNA合成の速度およびタンパク質合成の速度の観点から、転写／翻訳系用反応液中に0. 01 U/ $\mu$  L ~ 100 U/ $\mu$  L 含有されることが好ましく、0. 1 U/ $\mu$  L ~ 10 U/ $\mu$  L 含有されることがより好ましい。RNAポリメラーゼが0. 01 U/ $\mu$  L 未満であると、mRNAの合成量が少なくなり、結果としてタンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためあり、またRNAポリメラーゼが100 U/ $\mu$  L を越えると、タンパク質合成反応を

阻害する傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液中におけるATPは、タンパク質合成の速度の観点から、0.01mM～10mM含有されることが好ましく、0.1mM～5mM含有されることがより好ましい。ATPが0.01mM未満または10mMを越えると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液中におけるGTPは、タンパク質合成の速度の観点から、0.01mM～10mM含有されることが好ましく、0.1mM～5mM含有されることがより好ましい。GTPが0.01mM未満または10mMを越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液中におけるシチジン5'-三リン酸（以下、「CTP」ということがある。）は、タンパク質合成の速度の観点から、0.01mM～10mM含有されることが好ましく、0.1mM～5mM含有されることがより好ましい。CTPが0.01mM未満または10mMを越えると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液中におけるウリジン5'-三リン酸（以下、「UTP」ということがある。）は、タンパク質合成の速度の観点から、0.01mM～10mM含有されることが好ましく、0.1mM～5mM含有されることがより好ましい。UTPが0.01mM未満または10mMを越えると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液中におけるクレアチニンリン酸は、タンパク質を継続的に合成するための成分であって、ATPとGTPを再生する目的で配合される。クレアチニンリン酸は、タンパク質合成の速度の観点から、転写／翻訳系用反応液中において1mM～200mM含有されることが好ましく、10mM～100mM含有されることがより好ましい。クレアチニンリン酸が1mM未満であると、充分な量のATPとGTPが再生されにくく、結果としてタンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためであり、またクレアチニン酸が200mMを越えると、

阻害物質として働き、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液中におけるクレアチンキナーゼは、タンパク質を継続的に合成するための成分であって、クレアチニン酸と共にATPとGTPを再生する目的で配合される。クレアチンキナーゼは、タンパク質合成の速度の観点から、転写／翻訳系用反応液中において $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ ～ $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$ 含有されることが好ましく、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ ～ $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 含有されることがより好ましい。クレアチンキナーゼが $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 未満であると、充分な量のATPとGTPが再生されにくく、結果としてタンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためであり、またクレアチンキナーゼが $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$ を越えると、阻害物質として働き、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液中におけるアミノ酸成分は、20種類のアミノ酸、すなわち、バリン、メチオニン、グルタミン酸、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、グリシン、プロリン、イソロイシン、トリプトファン、アスパラギン、セリン、トレオニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、チロシン、リシン、グルタミン、シスチン、アルギニン、の20種類のアミノ酸を少なくとも含有する。このアミノ酸には、ラジオアイソトープ標識されたアミノ酸も含まれる。さらに、必要に応じて、修飾アミノ酸を含有していてもよい。当該アミノ酸成分は、通常、各種類のアミノ酸を概ね等量ずつ含有してなる。

タンパク質合成の速度の観点からは、転写／翻訳系用反応液中において上記のアミノ酸成分が $1\text{ }\mu\text{M}$ ～ $1000\text{ }\mu\text{M}$ 含有されることが好ましく、 $10\text{ }\mu\text{M}$ ～ $500\text{ }\mu\text{M}$ 含有されることがより好ましい。アミノ酸成分が $1\text{ }\mu\text{M}$ 未満または $1000\text{ }\mu\text{M}$ を越えると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液中におけるtRNAは、上記20種類のアミノ酸に対応した種類のtRNAを概ね等量ずつ含有してなる。tRNAは、タンパク質合成の速度の観点からは、転写／翻訳系用反応液中において $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ ～ $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$ 含有されることが好ましく、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ ～ $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 含有

されることがより好ましい。*t*RNAが1 $\mu$ g/mL未満または1000 $\mu$ g/mLを超えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液は、さらに、カリウム塩、マグネシウム塩、DTT、RNaseインヒビター、スペルミジンおよび緩衝剤を含有するのが好ましい。

転写／翻訳系用反応液中におけるカリウム塩としては、抽出用液の成分として上述した各種のカリウム塩、好適には酢酸カリウム、を好ましく使用できる。カリウム塩は、上述した抽出用液におけるカリウム塩の場合と同様の観点から、当該転写／翻訳系用反応液中において、10mM～500mM含有されることが好ましく、50mM～150mM含有されることがより好ましい。

転写／翻訳系用反応液中におけるマグネシウム塩としては、抽出用液の成分として上述した各種のマグネシウム塩、好適には酢酸マグネシウム、を好ましく使用できる。マグネシウム塩は、上述した抽出用液におけるマグネシウム塩の場合と同様の観点から、当該転写／翻訳系用反応液中において、0.1mM～10mM含有されることが好ましく、0.5mM～3mM含有されることがより好ましい。

転写／翻訳系用反応液中におけるDTTは、酸化防止の目的で配合されるものであり、当該反応液中において0.1mM～100mM含有されることが好ましく、0.2mM～20mM含有されることがより好ましい。DTTが0.1mM未満または100mMを越えると、タンパク質の合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液中におけるRNaseインヒビターは、抽出液に混在する節足動物由来のRNaseによって、転写／翻訳系合成反応の際にmRNAや*t*RNAが不所望に消化されて、タンパク質の合成を妨げるのを防ぐ目的で添加されるものであり、当該反応液中において0.1U/ $\mu$ L～100U/ $\mu$ L含有されることが好ましく、1U/ $\mu$ L～10U/ $\mu$ L含有されることがより好ましい。RNaseインヒビターが0.1U/ $\mu$ L未満であると、RNaseの分解

活性を充分抑えることができない傾向にあるためであり、またRNaseインヒビターが100U/ $\mu$ Lを越えると、タンパク質合成反応を阻害する傾向にあるためである。

上記スペルミジンは、転写における伸張反応を促進する目的で添加されるものであり、転写／翻訳系用反応液中において0.01mM～100mM含有されることが好ましく、0.05mM～10mM含有されることがより好ましい。スペルミジンが0.01mM未満であると、mRNAの合成速度が低下し生成するmRNAの量が少なくなり、結果としてタンパク質合成の速度が低下するというような傾向にあるためであり、またスペルミジンが100mMを越えると、タンパク質合成反応を阻害する傾向にあるためである。

転写／翻訳系用反応液に含有される緩衝剤としては、上述した抽出用液に用いたものと同様のものが好適に使用でき、同様の理由から、HEPES-KOH (pH 6～8) を使用するのが好ましい。また、緩衝剤は、上述した抽出用液における緩衝剤の場合と同様の観点から、1mM～200mM含有されることが好ましく、5mM～50mM含有されることがより好ましい。

また転写／翻訳系用反応液は、さらにグリセロールを添加されたものであるのがより好ましい。グリセロールを添加すると、転写／翻訳系合成反応においてタンパク質合成に必須な成分を安定化できるという利点があるためである。グリセロールを添加する場合、通常、5 (v/v) %～20 (v/v) %となるように添加する。

すなわち、転写／翻訳系用反応液としては、当該抽出液を30 (v/v) %～60 (v/v) %含有するとともに、さらに3  $\mu$ g/mL～600  $\mu$ g/mLの転写錆型、転写／翻訳系用反応液中A260で1～50の哺乳動物ミクロソーム膜（最終的に翻訳錆型との濃度比が、mRNA ( $\mu$ g/mL) : ミクロソーム膜濃度 (A260) = 1 : 0.1～0.5となるような量）、0.1U/ $\mu$ L～10U/ $\mu$ LのRNAポリメラーゼ、0.1mM～5mMのATP、0.1mM～5m

MのGTP、0.1 mM～5 mMのCTP、0.1 mM～5 mMのUTP、10 mM～100 mMのクレアチニン酸、10 μg/mL～500 μg/mLのクレアチニナーゼ、10 μM～500 μMのアミノ酸成分、10 μg/mL～500 μg/mLのtRNAを含有するのが好ましい。さらには、50 mM～150 mMの酢酸カリウム、0.5 mM～3 mMの酢酸マグネシウム、0.2 mM～20 mMのDTT、1 U/μL～10 U/μLのRNaseインヒビター、0.05 mM～10 mMのスペルミジン、5 mM～50 mMのHEPES-KOH (pH 7.4)、5 (v/v)%～20 (v/v)%のグリセロールを含有するよう実現されるのが好ましい。

上記転写／翻訳系用反応液を用いた無細胞系タンパク質合成反応（転写／翻訳系合成反応）についても、上記翻訳系合成反応の場合と同様、従来公知のたとえば低温恒温槽にて行えばよい。転写工程の反応温度は、通常、10 °C～60 °C、好ましくは20 °C～50 °Cの範囲内である。転写工程の反応温度が10 °C未満であると、転写の速度が低下する傾向にあり、また転写工程の反応温度が60 °Cを越えると、反応に必須な成分が変性する傾向にあるためである。また翻訳工程の温度は、通常、10 °C～40 °C、好ましくは20 °C～30 °Cの範囲内である。翻訳工程の反応温度が10 °C未満であると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあり、また翻訳工程の反応温度が40 °Cを越えると、反応に必須な成分が変性する傾向にあるためである。

転写／翻訳系合成反応では、転写、翻訳工程を連続して実施し得るという観点から両工程に好適な20 °C～30 °Cの範囲で反応を行うことが特に好ましい。反応の時間は、全工程あわせて、通常、1時間～72時間、好ましくは3時間～24時間である。

上記翻訳系用反応液、転写／翻訳系用反応液を使用して合成できるタンパク質に特に制限はないが、本発明の目的を鑑みると、翻訳後の修飾が行なわれるタンパク質であることが好ましい。合成されたタンパク質の量は、酵素の活性の測定

、 SDS-PAGE、免疫検定法などによって測定できる。翻訳後の修飾が適切に行われたか否かは、合成されたタンパク質を SDS-PAGE、フルオログラフィーに供与し、ミクロソーム膜存在下、非存在下での分子量の変化やプロテアーゼ処理に対する感受性から判定し得る。

### 実施例

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

#### 〔実施例 1〕

##### （1）発現プラスミドの調製

翻訳後修飾の中でも糖鎖修飾（N-グリコシル化）をモデルとしてとらえ、糖鎖修飾が生じることが既に判明している p r o - T N F - G L C (タンパク質の成熟領域内に N-グリコシル化部位を人為的に導入した変異型のヒト抗腫瘍因子) を用い、この糖タンパク質の *in vitro* の合成を試みた。図 1 に構築した発現プラスミドの模式図を示した。また、用いるポリヘドリン 5' - UTR の塩基配列を配列番号 1 に、 p r o - T N F - G L C 遺伝子の全塩基配列を配列番号 2 に示した。

発現プラスミドの構築は、 p T<sub>N</sub>T ベクター（プロメガ社製）を鑄型として、配列番号 3 および 4 に塩基配列を示した末端に B a m H I サイト付加した PCR プライマーを用い、 B a m H I 消化後にセルフライゲーションを行うことによって、マルチクローニングサイトの X h o I サイトの前に B a m H I サイトを導入した。更に配列番号 5 および 6 に塩基配列を示した PCR プライマーを用いて PCR を行い、 H i n d I I I 消化後にセルフライゲーションを行うことによって、 p T<sub>N</sub>T ベクターにもともと存在している T 7 ターミネーター配列直後の B a m H I サイトを H i n d I I I サイトに変更した。次に、 PCR によって、 B a

mH I サイトから T 7 プロモーターまでを増幅し、この間に前述したポリヘドリン 5' - UTR のセンス鎖、アンチセンス鎖を合成し、アニーリングさせたものをインサートとしてライゲーションさせることで改変型 pTNT ベクターを構築した。アニーリングのインサート調製方法は、以下のように行った。合成したセンス鎖、アンチセンス鎖を T 4 ポリヌクレオチドキナーゼ (TOYOBONO 社製) によって 5' 末端リン酸化を行った。反応後、センス鎖とアンチセンス鎖を混合し、95°C、5 分間熱処理した。これを室温になるまで静置し、アニーリングを行った。エタノール沈殿により精製した後、水に溶解させた。Sigma Spin Post Reaction Purification Column (シグマ社製) によって、過剰の ATP を除いた後、再度エタノール沈殿により精製した。

続いて、この改変型 pTNT ベクターを BamH I - EcoR I で消化し、pBluescript ベクターの BamH I - EcoR I サイトに pro-TNF GLC cDNA を導入したプラスミドを同じく BamH I - EcoR I 消化して得られた約 0.7 Kb の DNA 断片 (pro-TNF-GLC cDNA) をインサートとしてライゲーションさせることにより、in vitro pro-TNF-GLC 遺伝子転写用プラスミドー I を構築した。

また、転写用プラスミドー I 内の pro-TNF GLC の下流にヒスチジンタグを挿入した in vitro pro-TNF-GLC 遺伝子転写用プラスミドー II も作製した。転写用プラスミドー II は、改変型 pTNT ベクターを Sma I で消化した後、この間に、配列番号 7 記載のヒスチジンタグのセンス鎖、アンチセンス鎖を合成し、アニーリングさせたものをインサートとしてライゲーションさせることで改変型 pTNT ベクター (His-Tag) を構築した。このベクターを BamH I - EcoR I で消化し、転写用プラスミドー I を鑄型に配列番号 8 および 9 記載の PCR プライマーを用いて増幅した約 0.7 Kb の DNA 断片をインサートとしてライゲーションせることにより作製した。

全てのPCRの条件は、KOD-plus (TOYOB<sup>0</sup>社製) を用いて、96°C 2分で錆型DNAを変性させた後、96°C 15秒、50°C 30秒、68°C 5分のサイクル反応を30回行った。

構築したプラスミドの塩基配列はDNA 250ngを錆型としてBig Dye Terminator Cycle Sequence FS Ready Reaction Kit (ABI社製) を用いてPCR (96°C 10秒、50°C 5秒、60°C 4分、25サイクル) を行い、反応液をABI PRISM 310 Genetic Analyzer (ABI社製) で解析した。

全てのライゲーションサンプルは、Ligation High (TOYOB<sup>0</sup>社製) を用いてライゲーションを行った後、大腸菌DH5 $\alpha$  (TOYOB<sup>0</sup>社製) に形質転換し、形質転換後の大腸菌からアルカリ-SDS法によりプラスミドを調製し、DNA塩基配列の解析を行った。

## (2) *in vitro* 転写反応およびmRNAの精製

上記(1)で調製したプラスミドをHindIIIで消化した後、フェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。得られたDNA 1 $\mu$ gを錆型として、RiboMax Large Scale RNA Production System-T7 (プロメガ社製) を用いて、20 $\mu$ lスケールで37°C 4時間、mRNA合成を行った。反応後、1UのRQ1 RNase Free DNase (プロメガ社製) を添加し、37°C 15分インキュベートし、錆型DNAを消化した。フェノールクロロホルム抽出によりタンパク質を除去した後、エタノール沈殿を行った。得られた沈殿を100 $\mu$ lの滅菌水に溶解し、Nick column (アマシャム社製) で精製した後、再度エタノール沈殿を行い、最終的にA260/A280 = 1.8~2.0、RNA濃度が2mg/mlとなるように滅菌水に溶解した。このようにして調製したmRNAは無細胞系タンパク質合成にそのまま使用した。転写用プラスミド-Iから転写したものをmRNA-I、転写用プラスミド-IIから転写したものをmRNA-II

とした。

(3) 昆虫培養細胞High Five、Sf 21からのミクロソーム膜調製方法。

(3-1) 昆虫培養細胞High FiveおよびSf 21の培養

細胞数2.  $1 \times 10^7$  個の昆虫培養細胞High Five (Invitrogen社製) を、L-グルタミンを添加したExpress Five (Invitrogen社製) 無血清培地を入れた培養フラスコ ( $600 \text{ cm}^2$ ) 内で27°C 6日間培養した。結果、細胞数1.  $0 \times 10^8$  個、湿重量1. 2 g となった。

昆虫培養細胞Sf 21 (Invitrogen社製) を、Sf-90011S FM (Invitrogen社製) 無血清培地にて27°Cで培養した。培地1 mlあたり細胞数6.  $0 \times 10^5$  個のSf 21を125 ml三角フラスコ内の培地50 ml中で27°C、130 rpm、5日間懸濁培養を行った結果、細胞数1.  $0 \times 10^8$  個、湿重量3 g となった。

(3-2) ミクロソーム膜調製方法

昆虫培養細胞High FiveおよびSf 21からのミクロソーム膜の調製は、基本的にWalter, P. and Blobel, G. (1983), Enzymol. 96, 84-93らの方法を基に、ショ糖密度勾配による超遠心分離にて調製した。すなわち、上記(3-1)で培養した昆虫培養細胞を集め、下記の抽出用液で1回洗浄 ( $700 \times g$ 、4°C、10分間の遠心条件) した後、培養細胞1 gあたり4 mlの抽出用液中に懸濁した。

[High Five抽出用液の組成]

30 mM HEPES-KOH (pH 7.9)、100 mM KOAc、2 mM Mg (OAc)<sub>2</sub>、0.25 mM EGTA、250 mM シュクロース、2 mM DTT、0.5 mM PMSF

[Sf 21抽出用液の組成]

40 mM HEPES-KOH (pH 7.9)、100 mM KOAc、1.5 mM Mg (OAc)<sub>2</sub>、0.1 mM EGTA、250 mM シュクロース、2 mM DTT、0.5 mM PMSF

懸濁後、きつく合せられたダウンスホモジナイザー (Dounce homogenizer) を20回往復することにより、細胞を破碎した。破碎後、1000×g、4°C、10分間遠心分離して細胞残渣を取り除き、上清を回収した。この上清からシュクロースの密度勾配による超遠心分離でミクロソーム膜画分を分離した。超遠心分離の際、容器の下から順に1.3Mのシュクロースを含む抽出用液と先程回収した上清を1:3の体積比 (v/v) で満たした。このサンプルを140000×g、4°C、2時間半超遠心分離 (HITACHI 社製超遠心分離機 CP80MX とスイングローター P40ST を用いた) した。超遠心分離後、上清を全て破棄し、沈殿をスタート時の細胞湿重量1gあたり100μlの抽出用液で静かに懸濁し、これをミクロソーム膜とした。このミクロソーム膜のA260/A280は1.4~1.5、A260は約150であった。

#### (4) 無細胞系タンパク質合成

(4-1) 節足動物由来の抽出物を含有する無細胞系タンパク質合成用抽出液による無細胞系タンパク質合成

上記(2)で調製したpro-TNF GLCのmRNA-I、および上記(3)で調製したミクロソーム膜を用いて、節足動物由来の抽出物を含有する無細胞系タンパク質合成用抽出液による無細胞系タンパク質合成を行った。

#### (カイコ抽出液の調製)

5齢期4日目のカイコ幼虫15匹よりハサミ、ピンセット、メス、スパークルを使用して、後部絹糸腺3.07gを摘出し、これを-80°Cで凍結させた乳鉢ですり潰し、下記組成の抽出用液を用いて、抽出を行った。

#### 〔抽出用液の組成〕

• 20 mM HEPES-KOH (pH 7.4)

- 100 mM 酢酸カリウム
- 2 mM 酢酸マグネシウム
- 2 mM DTT
- 0.5 mM PMSF

抽出後、得られた液状物を遠心分離機 (himac CR20B3 (日立工機社製)) にて、30,000×g、30分間、4°Cの条件にて遠心分離を行った。

遠心分離後、上清のみを単離し、再び30,000×g、10分間、4°Cの条件にて遠心分離を行った。遠心分離後、上清のみを単離した。脱塩カラム PD-10 (アマシャム バイオサイエンス社製) に、20%グリセロールを含む抽出用液を加えカラムを平衡化した後、上清を供給し、上記抽出用液にて溶出することによりゲルfiltrationを行った。

ゲルfiltration後の濾液の画分を、分光光度計 (Ultrospec 3300 pro、アマシャム バイオサイエンス社製) を用いて、280 nmにおける吸光度が1.0以上の画分を分取して、5齢期のカイコ幼虫の後部絹糸腺由来の無細胞系タンパク質合成用抽出液を得た。

得られた抽出液について、BCA Protein assay Kit (PIERCE社製) を用い、タンパク質濃度を測定した。まず反応試薬2 mLに対してサンプルを0.1 mL加え、37°Cで30分間反応させ、分光光度計 (Ultrospec 3300 pro、アマシャム バイオサイエンス社製) を用いて、562 nmにおける吸光度を測定した。コントロールとして、BSAを用い、検量線を作成した。

抽出液中におけるカイコ幼虫の後部絹糸腺の含有量は、タンパク質濃度で17.5 mg/mLであった。

(昆虫培養細胞抽出液の調製)

(1) High Five 由来抽出液

細胞数2.1×10<sup>7</sup>個の昆虫培養細胞High Five (In vitro

gen社製)を、L-グルタミンを添加したExpress Five無血清培地(Invitrogen社製)を入れた培養フラスコ(600cm<sup>2</sup>)内で27°Cで6日間培養した。結果、細胞数1.0×10<sup>8</sup>個、湿重量1.21gとなつた。

次いで上記培養した昆虫培養細胞を集め、下記組成の洗浄液で3回洗浄(700×g、4°C、10分間の条件で遠心分離)した。

#### [洗浄液の組成]

- 60mM HEPES-KOH (pH 7.9)
- 200mM 酢酸カリウム
- 4mM 酢酸マグネシウム
- 4mM DTT

洗浄後の昆虫培養細胞に、下記組成の抽出用液を1mL加え、懸濁した。

#### [抽出用液の組成]

- 40mM HEPES-KOH (pH 7.9)
- 100mM 酢酸カリウム
- 2mM 酢酸マグネシウム
- 2mM 塩化カルシウム
- 20(v/v)% グリセロール
- 1mM DTT
- 1mM PMSF

この懸濁液を液体窒素中に急速に凍結させた。充分に凍結させた後、約4°Cの氷水浴中で解凍した。完全に解凍した後、30,000×g、4°Cで10分間遠心分離(himac CR20B3、日立工機社製)し、上清を回収した。回収した上清1.5mLを下記組成のゲル濾過用緩衝液で平衡化したPD-10脱塩カラム(アマシャムバイオサイエンス社製)にアプライした。

#### [ゲル濾過用緩衝液の組成]

• 40 mM	HEPES-KOH (pH 7. 9)
• 100 mM	酢酸カリウム
• 2 mM	酢酸マグネシウム
• 1 mM	DTT
• 1 mM	PMSF

アプライした後、ゲル濾過用緩衝液4mLにて溶出し、分光光度計 (Ultrospec 3300 pro、アマシャム バイオサイエンス社製) を用いて、280nmにおける吸光度が30以上の画分を回収し、昆虫培養細胞抽出液とした。

#### (2) Sf21由来抽出液

昆虫細胞Sf21 (Invitrogen社製) をSf900-11無血清培地 (Invitrogen社製) 中にて27°Cで培養した。培地1mLあたりの細胞数  $6.0 \times 10^5$  個のSf21を125mL三角フラスコ内の培地50mL中で27°C・130rpm・5日間懸濁培養を行った。結果、培地1mLあたりの細胞数  $1.0 \times 10^8$  個、湿重量3gとなった。

次いで、上記培養した昆虫細胞を集め、下記組成の洗浄液にて3回洗浄 (700×g、4°C、10分間の条件で遠心分離) した後、3mLの下記組成の抽出用液中に懸濁した。〔洗浄液の組成〕

• 40 mM	HEPES-KOH (pH 7. 9)
• 100 mM	酢酸カリウム
• 2 mM	酢酸マグネシウム
• 2 mM	塩化カルシウム
• 1 mM	DTT

#### 〔抽出用液の組成〕

・ 40 mM	HEPES-KOH (pH 7. 9)
・ 100 mM	酢酸カリウム
・ 2 mM	酢酸マグネシウム
・ 2 mM	塩化カルシウム
・ 20% (v/v)	グリセロール
・ 1 mM	DTT
・ 0. 5 mM	PMSF

この細胞懸濁液を液体窒素中に急速に凍結させた。充分に凍結させた後、約4°Cの氷水浴中で解凍した。完全に解凍した後、30000×g、4°Cで10分間遠心分離 (himac CR20B3、日立工機社製) し、上清1Aを回収した。回収した上清1Aをさらに45000×g、4°Cで30分間遠心分離 (himac CR20B3、日立工機社製) して上清1Bを回収した。回収した上清1Bを下記組成のゲル濾過用緩衝液で平衡化したPD-10脱塩カラム (アマシャムバイオサイエンス社製) に2.5mLアプライした

。

#### [ゲル濾過用緩衝液の組成]

・ 40 mM	HEPES-KOH (pH 7. 9)
・ 100 mM	酢酸カリウム
・ 2 mM	酢酸マグネシウム
・ 1 mM	DTT
・ 0. 5 mM	PMSF

アプライした後、ゲル濾過用緩衝液3mLにて溶出し、分光光度計 (Ultraviolet 3300 pro、アマシャムバイオサイエンス社製) を用いて、280 nmにおける吸光度が30以上の画分を回収し、これを昆虫細胞抽出液とした。

カイコ後部絹糸腺由来抽出液、昆虫培養細胞 (High Five、Sf21

) 由来抽出液の3種について無細胞系タンパク質合成を行った。また、このときそれぞれの反応開始時間に、上記(3)で調製した節足動物由来のミクロソーム膜を種々の濃度添加して、共反応させることによりタンパク質のグリコシル化を行った。また参考例では、節足動物由来のミクロソーム膜の代わりに犬脾臓ミクロソーム膜(プロメガ社製)を用いた。

以下に種々の抽出液を用いた場合の反応組成を記載するが、各成分の濃度は特に断りのない限り反応液中の最終濃度で示す。

#### カイコ後部絹糸腺由来抽出液を用いた合成

- ・ 昆虫由来ミクロソーム膜(反応液1μl中A260=0~50)
- ・ 50(v/v)% 節足動物由来(カイコ後部絹糸腺由来)抽出液
- ・ 160μg/mL mRNA
- ・ 30mM HEPES-KOH(pH7.4)
- ・ 100mM 酢酸カリウム
- ・ 1.5mM 酢酸マグネシウム
- ・ 0.5mM DTT
- ・ 10(v/v)% グリセロール
- ・ 0.75mM ATP
- ・ 0.5mM GTP
- ・ 0.25mM EGTA
- ・ 25mM クレアチニンリン酸
- ・ 200μg/mL クレアチニキナーゼ
- ・ 100μM アミノ酸(20種)
- ・ 2U/μL RNaseインヒビター
- ・ 100μg/mL tRNA

ATP(シグマ社製)、GTP(シグマ社製)、アミノ酸(20種)(シグマ社製)、RNaseインヒビター(宝酒造社製)、tRNA(ロシュ・ダイアグノステ

イックス社製)をそれぞれ用いた。

反応装置として低温アルミブロック恒温槽MG-1000(東京理化器械社製)を用いた。翻訳反応は反応温度25°Cで6時間行い、反応液量は25μLとした。

#### 昆虫培養細胞由来抽出液を用いた合成

##### (1) High Five由来抽出液を用いた場合

- ・昆虫由来ミクロソーム膜(反応液1μl中A260=0~50)
- ・50(v/v)%節足動物由来(High Five由来)抽出液
- ・320μg/mL mRNA
- ・40mM HEPES-KOH(pH7.9)
- ・100mM 酢酸カリウム
- ・2mM 酢酸マグネシウム
- ・2mM DTT
- ・10(v/v)%グリセロール
- ・0.5mM ATP
- ・0.25mM GTP
- ・20mM クレアチニン酸
- ・200μg/mL クレアチニナーゼ
- ・80μM アミノ酸(20種)
- ・0.25mM EGTA
- ・1U/μL RNaseインヒビター
- ・200μg/mL tRNA

ATP(シグマ社製)、GTP(シグマ社製)、アミノ酸(20種)(シグマ社製)、RNaseインヒビター(宝酒造社製)、tRNA(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)をそれぞれ用いた。

反応装置として低温アルミブロック恒温槽MG-1000(東京理化器械社製

) を用いた。翻訳反応は反応温度25°Cで8時間行い、反応液量は25μLとした。

(2) Sf21由来抽出液を用いた場合

- ・ 昆虫由来ミクロソーム膜 (反応液1μL中A260=0~50)
- ・ 50(v/v)% 節足動物由来(Sf21由来)抽出液
- ・ 40mM HEPES-KOH (pH 7.9)
- ・ 100mM 酢酸カリウム
- ・ 1.5mM 酢酸マグネシウム
- ・ 2mM DTT
- ・ 10(v/v)% グリセロール
- ・ 0.25mM ATP
- ・ 0.1mM GTP
- ・ 20mM クレアチニン酸
- ・ 200μg/mL クレアチニナーゼ
- ・ 80μM アミノ酸(20種)
- ・ 0.1mM EGTA
- ・ 1U/μL RNaseインヒビター
- ・ 200μg/mL tRNA
- ・ 320μg/mL 外来mRNA (pro-TNF-GLC遺伝子)

ATP(シグマ社製)、GTP(シグマ社製)、アミノ酸(20種)(シグマ社製)、RNaseインヒビター(宝酒造社製)、tRNA(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)をそれぞれ用いた。反応装置として低温アルミブロック恒温槽MG-1000を用いた。反応液量は25μL、反応温度は25°C、反応時間は6時間で実施した。

(4-2) 哺乳動物由来の抽出物を含有する無細胞系タンパク質合成用抽出液による無細

### 胞系タンパク質合成

上記(2)で調製したp r o-TNF GLCのmRNA-11、および上記(3)で調製したミクロソーム膜を用いて、ウサギ網状赤血球抽出液(RRL; プロメガ社製)による無細胞系タンパク質合成を行った。また、この時それぞれの反応開始時に、上記(3)で調製したミクロソーム膜を種々の濃度添加して、共反応させることによりタンパク質のグリコシル化を行った。

- ・翻訳系反応液中A 260=0~50のミクロソーム膜
- ・50(v/v)% ウサギ網状赤血球抽出液 17.5μl
- ・2mg/mL mRNA 2μl
- ・40U/μL RNaseインヒビター 1μl
- ・1mM アミノ酸(20種) 1μl

アミノ酸(20種)はシグマ社製のものを、RNaseインヒビターは宝酒造社製のものをそれぞれ用いた。

反応装置として低温アルミブロック恒温槽MG-1000(東京理化器械社製)を用いた。翻訳反応は反応温度30℃で90分間行い、反応液量は25μLとした。

(5) 上記(4)の無細胞系タンパク質合成により合成した翻訳反応産物の脱糖鎖

上記(4)で合成したN-グリコシル化タンパク質(p r o-TNF GLC)が糖鎖修飾された糖タンパク質であることを確認するために、N型糖鎖分解酵素で脱糖鎖化を行った。N型糖鎖分解酵素としてグリコペプチダーゼF(TAKARA社製)を用い、これを翻訳反応終了後の反応液10μlあたり1μl添加し、25℃で2時間反応させた。

(6) N-グリコシル化タンパク質の検出

N-グリコシル化タンパク質の検出は、抗TNF抗体(R&D社製)を用いたウェスタンプロット法とECL-plus(アマシャム社製)による化学発光を

用いて行った。すなわち、昆虫抽出液においては、翻訳反応および脱糖鎖反応終了後、SDS化のため当量の×2 Sample Buffer Soln. (Wako社製)を加えて95°C、3分間熱処理を行い、SDS-PAGEに供した。また、ウサギ網状赤血球抽出液においては、SDS化の前処理として、反応液10μlに対し、2μl PMSF (40mM)、200μl RIPAバッファー (50mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl、1% Nonidet P-40、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS)を添加し、ローテーターにて4°C、1時間攪拌して可溶化処理を行った。さらにHis-MicroSpin Purification Module (アマシャムバイオサイエンス社製)にて簡易精製し、これをサンプルとし、等量の×2 Sample Buffer Soln. (Wako社製)を加えて95°C、3分間熱処理を行い、SDS-PAGEに供した。泳動後PVDF膜にタンパク質の転写を行った。転写後の膜は、3%ゼラチンを含むTTBS (20mM Tris、500mM NaCl、0.05% Tween-20、pH7.5)で室温で穏やかに振とうし、ブロッキング処理を行った。ブロッキング後TTBSで10分間振とうして膜を洗浄した。1/200量の抗TNF抗体および1%ゼラチンを含むTTBSで穏やかに2時間～12時間反応させた。膜をTCBS (20mM citrate、500mM NaCl、0.05% Tween-20、pH5.5)で5分間×2回、振とうして洗浄した。膜を1%ゼラチンを含むTCBS 100mlあたり33μlのProtein-G-Horseradish Peroxidase Conjugate (Bio Rad社製)を加えた液中で2時間穏やかに振とうさせて反応させた。TTBSで10分間振とうして洗浄後、ECL-plusを用いて化学発光を行い、X線フィルムに露光後現像した。

#### (7) ウエスタンプロットの結果

上記方法により検出したウエスタンプロットの結果を図2および図3に示した

。

図2において、上段はカイコ後部繩糸腺由来抽出液(BML)、中段は昆虫培養細胞High Five抽出液(HFL)、昆虫培養細胞Sf21細胞抽出液(Sf21L)を用いてミクロソーム膜存在下で翻訳を行った結果を示した。添加したミクロソーム膜は左から犬臍臓ミクロソーム膜(CMM、プロメガ社製)、昆虫培養細胞High Five由来ミクロソーム膜(HFMM)、昆虫培養細胞Sf21由来ミクロソーム膜(Sf21MM)をそれぞれ添加し、翻訳と共に反応したものである。ミクロソーム膜の添加量は、A260の値で示してある。

これらの結果から、BML、FHL、Sf21Lの全ての抽出液において、HFMMおよびSf21MMをそれぞれ添加した場合に、犬臍臓ミクロソーム膜添加時よりも効率良いN-グリコシル化が生じることが判明した。また、このシフトバンドはグリコペプチダーゼF消化により顕著に減少したことから、N型糖鎖付加タンパク質であることが確認できた。

以上から、昆虫由来抽出液に昆虫由来ミクロソーム膜を添加することで、効率よいタンパク質の糖鎖修飾が可能であることが示された。

同様に図3において、ウサギ網状赤血球抽出液を用いて、ミクロソーム膜存在下で翻訳を行った結果を示した。添加したミクロソーム膜は左から昆虫培養細胞High Five由来ミクロソーム膜(HFMM)、昆虫培養細胞Sf21由来ミクロソーム膜(Sf21MM)である。それぞれ添加した場合に効率良いN-グリコシル化が生じることが判明した。また、このシフトバンドはグリコペプチダーゼF消化により顕著に減少したことから、N型糖鎖付加タンパク質であることが確認できた。

以上から、ウサギ網状赤血球抽出液においても、昆虫由来ミクロソーム膜を添加することで、効率よいタンパク質の糖鎖修飾が可能であることが示された。

なお、配列表における人工配列(Artificial Sequence)を説明するフリーテキス

ト項目<223>において、配列番号1は、E o N P V (バキュロウイルス) ポリヘドリン遺伝子5'UTRの塩基配列；配列番号2は、p r o - T N F G I C C DNAの塩基配列；配列番号3は、PCRプライマー；配列番号4は、PCRプライマー；配列番号5は、PCRプライマー；配列番号6は、PCRプライマー；配列番号7は、H i s - T a g (ヒスチジンタグ) をコードするDNA；配列番号8は、PCRプライマー；及び配列番号9は、PCRプライマーである。

## 請求の範囲

1. 無細胞系タンパク質合成用抽出液を用いる無細胞系でのタンパク質合成方法であって、翻訳反応を節足動物由来のミクロソーム膜の存在下で行うことを含む方法。
2. mRNA濃度 ( $\mu$  g/ml) と節足動物由来のミクロソーム膜の濃度 (A260)との比が1:0.1~5で翻訳反応を行う請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 当該比が1:0.3~2.3である、請求の範囲第2項に記載の方法。
4. 節足動物由来のミクロソーム膜が昆虫組織から抽出されたものである、請求の範囲第1項に記載の方法。
5. 昆虫組織がカイコ組織である、請求の範囲第4項に記載の方法。
6. カイコ組織が脂肪体である、請求の範囲第5項に記載の方法。
7. 節足動物由来のミクロソーム膜が昆虫培養細胞から抽出されたものである、請求の範囲第1項に記載の方法。
8. 昆虫培養細胞が*Trichoplusia ni*卵細胞由来あるいは*Spodoptera frugiperda*卵巣細胞由来の培養細胞である、請求の範囲第7項に記載の方法。
9. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、節足動物由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第1項に記載の方法。
10. 節足動物由来の抽出物が昆虫組織から抽出されたものである、請求の範囲第9項に記載の方法。
11. 昆虫組織がカイコ組織である、請求の範囲第10項に記載の方法。
12. カイコ組織がカイコ幼虫の後部絹糸腺を少なくとも含有する、請求の範囲第11項に記載の方法。

13. 節足動物由来の抽出物が昆虫培養細胞から抽出されたものである、請求の範囲第9項に記載の方法。

14. 昆虫培養細胞が *Trichoplusia ni* 卵細胞由来あるいは *Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞由来の培養細胞である、請求の範囲第13項に記載の方法。

15. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、小麦胚芽由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第1項に記載の方法。

16. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、哺乳動物培養細胞由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第1項に記載の方法。

17. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、ウサギ網状赤血球由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第1項に記載の方法。

18. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、大腸菌由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第1項に記載の方法。

19. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、酵母由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第1項に記載の方法。

20. 無細胞系タンパク質合成用抽出液を用いる無細胞系でのタンパク質合成において、翻訳反応を節足動物由来のミクロソーム膜の存在下で行うことと含む、翻訳後のタンパク質の修飾方法。

21. mRNA 濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) と節足動物由来のミクロソーム膜の濃度 (A260)との比が 1:0. 1~5 で翻訳反応を行う請求の範囲第20記載の方法。

22. 当該比が 1:0. 3~2. 3 である、請求の範囲第21記載の方法。

23. 節足動物由来のミクロソーム膜が昆虫組織から抽出されたものである、請求の範囲第20項に記載の方法。

24. 昆虫組織がカイコ組織である、請求の範囲第23項に記載の方法。

25. カイコ組織が脂肪体である、請求の範囲第24項に記載の方法。

26. 節足動物由来のミクロソーム膜が昆虫培養細胞から抽出されたものである、請求の範囲第20項に記載の方法。

27. 昆虫培養細胞が *Trichoplusia ni* 卵細胞由来あるいは *Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞由来の培養細胞である、請求の範囲第26項に記載の方法。

28. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、節足動物由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第20項に記載の方法。

29. 節足動物由来の抽出物が昆虫組織から抽出されたものである、請求の範囲第28項に記載の方法。

30. 昆虫組織がカイコ組織である、請求の範囲第29項に記載の方法。

31. カイコ組織がカイコ幼虫の後部絹糸腺を少なくとも含有する、請求の範囲第30項に記載の方法。

32. 節足動物由来の抽出物が昆虫培養細胞から抽出されたものである、請求の範囲第28項に記載の方法。

33. 昆虫培養細胞が *Trichoplusia ni* 卵細胞由来あるいは *Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞由来の培養細胞である、請求の範囲第32項に記載の方法。

34. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、小麦胚芽由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第20項に記載の方法。

35. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、哺乳動物培養細胞由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第20項に記載の方法。

36. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、ウサギ網状赤血球由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第20項に記載の方法。

37. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、大腸菌由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第20項に記載の方法。

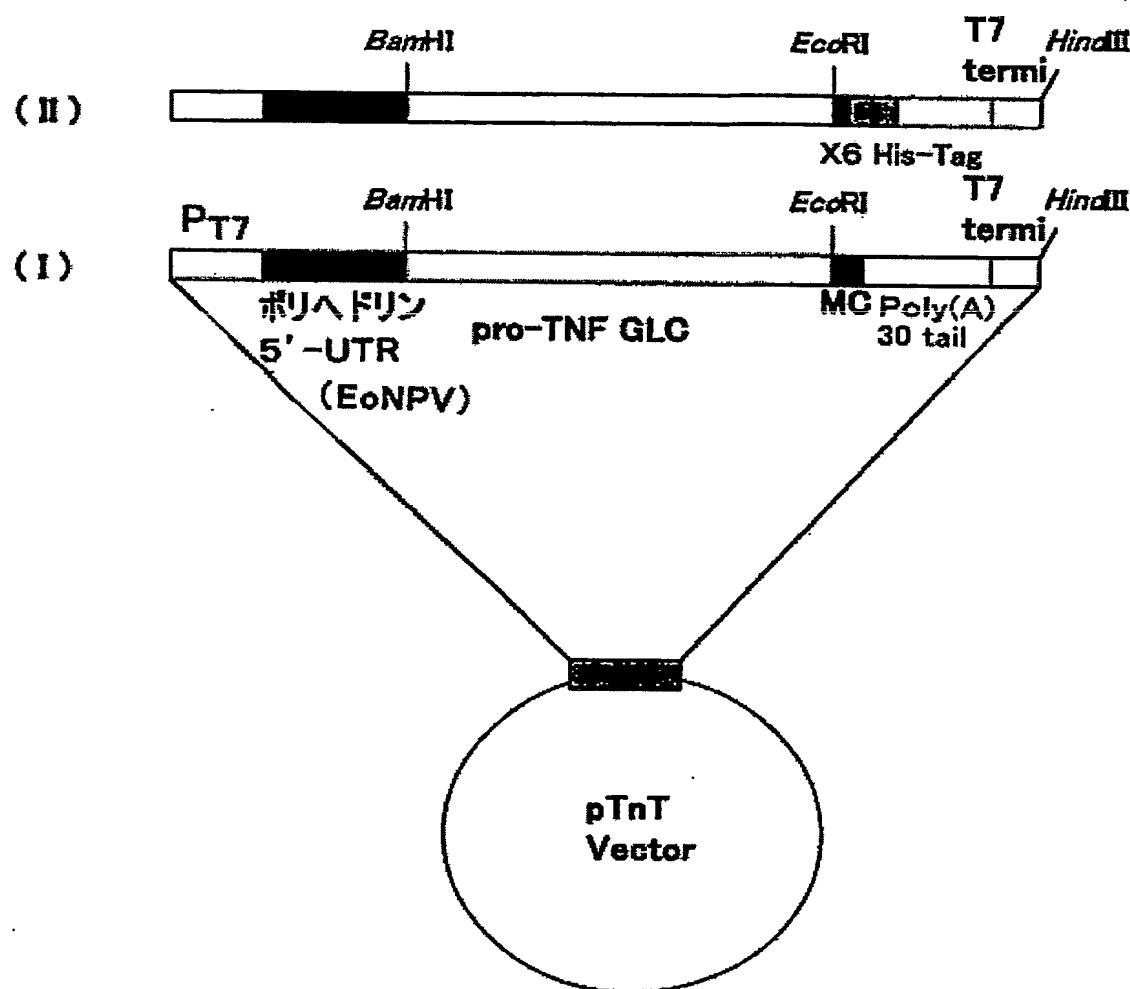
38. 無細胞系タンパク質合成用抽出液が、酵母由来の抽出物を含有するものである、請求の範囲第20項に記載の方法。

39. 翻訳後のタンパク質の修飾が、N-グリコシル化および／またはシグナル配列の切除である、請求の範囲第20項に記載の方法。

40. 請求の範囲第1項に記載のタンパク質合成方法によって得られた、N-グリコシル化されたタンパク質。

41. 請求の範囲第1項に記載のタンパク質合成方法によって得られた、シグナル配列が切除されたタンパク質。

図 1



2 / 3

図2

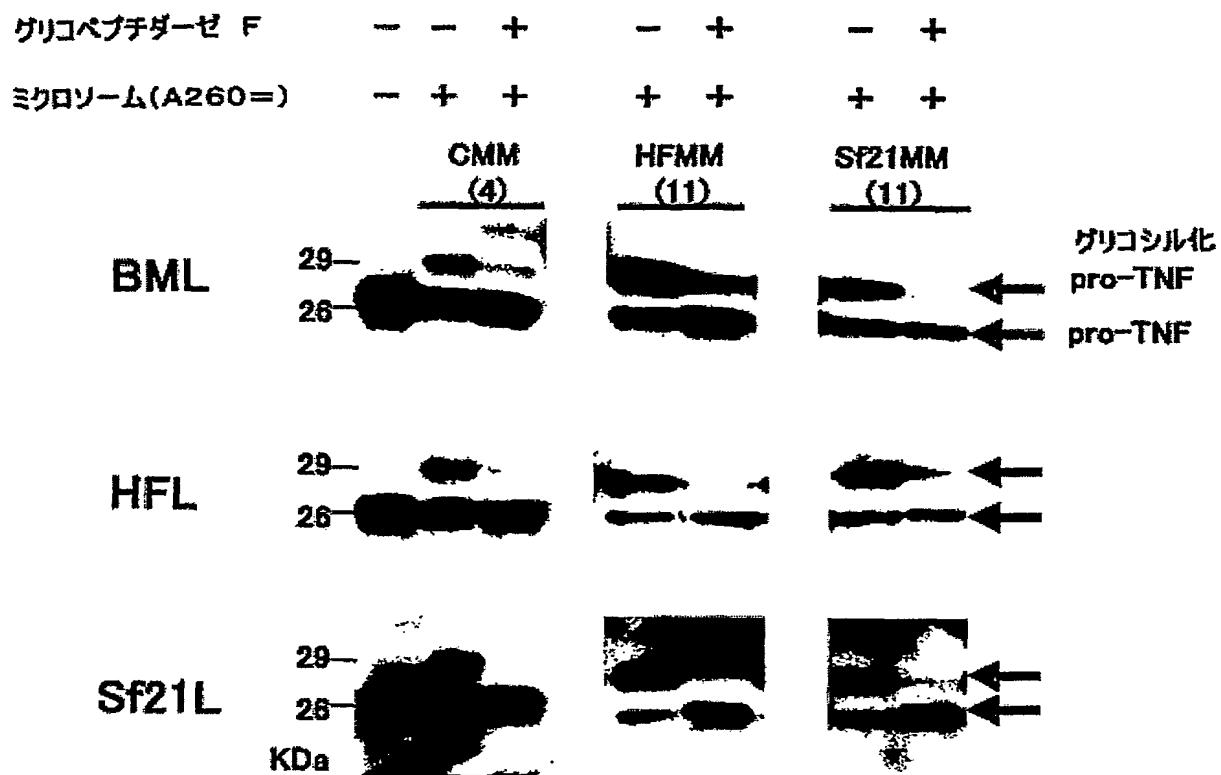
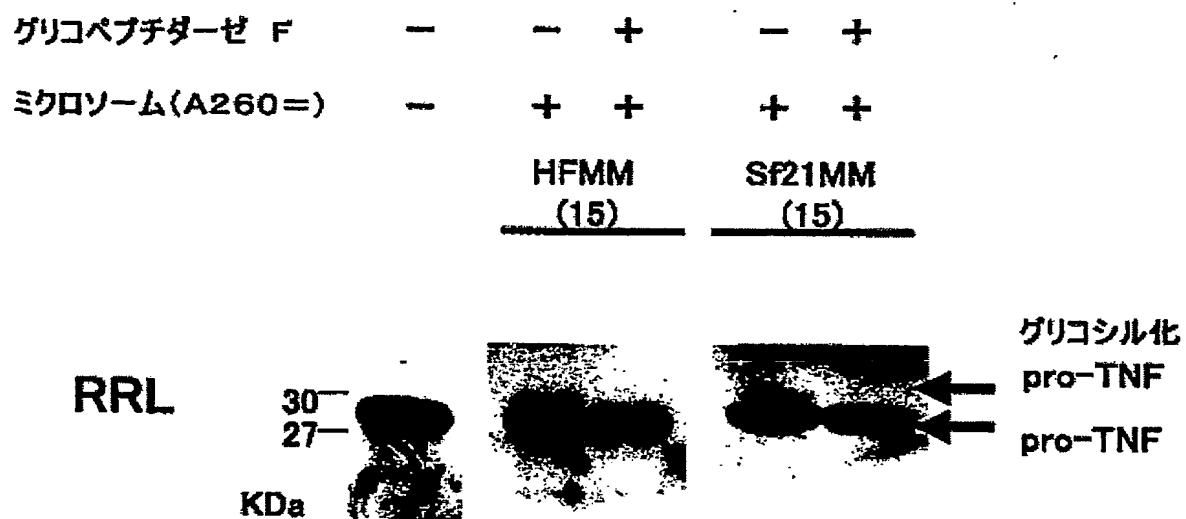


図3



## SEQUENCE LISTING

<110> SHIMADZU CORPORATION, National University Corporation Yamaguchi University

<120> Method of posttraslational modification by addition of microsome membrane in cell-free protein synthesis

<130> G104090W0

<150> JP 2003-384387

<151> 2003-11-13

<160> 9

<210> 1

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' UTR (EoNPV polyhedrin gene)

<400> 1

agtatttgtat tccttcgtat atttgttgtat aatctaaaa tacaccgtat 49

<210> 2

<211> 702

<212> DNA

<213> homo sapience

<220>

<223> pro-TNF GLC

<400> 2

atgagcactg aaagcatgtat ccgggacgtg gagctggccg aggaggcgat ccccaagaag	60
acaggggggc cccagggttc caggcgggtgc ttgttcctca gcctcttc cttcctgatc	120
gtggcaggcg ccaccacgtt cttctgcctg ctgcactttg gagtgatcg ccccccagagg	180
gaagagtccc ccaggacatc ctctctaatac agccctctgg cccaggcagt cagatcatct	240
tctcgaaccc cgagtacaa gcctgttagcc catgttgtat caaacccctca agctgagggg	300
cagctccagt ggctgaaccg ccgggccaat gcccctctgg ccaatggcgat ggagctgaga	360
gataaccaggc tggtggtgcc atcagaggc ctgtacatca tctactccca ggtcctcttc	420
aaggggccaag gctgcccctc caccatgtg ctccatcccc acaccatcg ccgcatcgcc	480
gtctccttacc agaccaaggat caaccccttc tctgccccatca agagccccctg ccagaggag	540

accccagagg gggctgaggc caagccctgg tatgagccca tctatctggg aggggtcttc 600  
cagctggaga agggtgacccg actcagcgct gagatcaatc ggcccgacta tctcgacttt 660  
gccgagtctg ggcaggtcta ctggggatc attgccctgt ga

<210> 3  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> PCR primer

<400> 3  
ttggatcccg caaaaagaac 20

<210> 4  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> PCR primer

<400> 4  
gttcttggat ccctcgagaa t 21

<210> 5  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> PCR primer

<400> 5  
cccaagctta aaaaacccct c 21

<210> 6  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

aaaaagcttc ccctggcgta a 21

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> His-Tag coding DNA

<400> 7

ccaccaccac caccaccact ga 22

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 8

cgggatccat gagcactgaa agcatg 26

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 9

cggaattcca gggcaatgat cccaaa 26

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/017219

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> C12P21/02, C07K14/00, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12P21/02, C07K14/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JSTPlus (JOIS), BIOSIS/WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq,  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	Gillies S. et al., Translation of vesicular stomatitis and Sindbis virus mRNAs in cell-free extracts of Aedes albopictus cells, J.Biol. Chem., 1981, Vol.256, No.24 pages 13188-92	1-4, 9-10, 20-23, 28-29, 39 11-19, 30-38 5-8, 24-27, 40
Y A	Davis J.W., Cell-free protein synthesizing systems isolated from an insect cell line, Insect Biochem., 1977, Vol.7, pages 77 to 83	1-4, 9-23, 28-39 5-8, 24-27, 40
Y A	JP 2003-235598 A (Rengo Co., Ltd.), 26 August, 2003 (26.08.03), Full text (Family: none)	1-4, 9-14, 20-23, 28-33, 39 5-8, 15-19, 24-27, 34-38, 40

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 January, 2005 (07.01.05)

Date of mailing of the international search report  
25 January, 2005 (25.01.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017219

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2003-245094 A (Renyo Co., Ltd.), 02 September, 2003 (02.09.03), Full text (Family: none)	1-4, 9-14, 20-23, 28-33, 39 5-8, 15-19, 24-27, 34-38, 40
Y A	FUJIWARA, H. et al., Small RNAs of the silkworm, <i>Bombyx mori</i> as revealed in vitro capping and in vitro transcription, <i>Comp. Biochem. Physiol.B.</i> , 1988, Vol.91, No.2, pages 383-8	1-4, 9-14, 20-23, 28-33, 39 5-8, 15-19, 24-27, 34-38, 40
Y A	SAKURAI, H. et al., In vitro transcription of the plasma protein genes of <i>Bombyx mori</i> , <i>Biochim. Biophys. Acta.</i> , 1990, Vol.1087, No.1, pages 18 to 24	1-4, 9-14, 20-23, 28-33, 39 5-8, 15-19, 24-27, 34-38, 40
Y A	Scott M.P., Cell-free protein synthesis in lysates of <i>Drosophila melanogaster</i> cells, <i>Biochemistry</i> , 1979, Vol.18, No.8, pages 1588-94	1-4, 9-14, 20-23, 28-33, 39 5-8, 15-19, 24-27, 34-38, 40
Y A	WO 00/50586 A2 (European Molecular Biology Laboratory), 31 August, 2000 (31.08.00), Full text (Family: none)	1-4, 9-14, 20-23, 28-33, 39 5-8, 15-19, 24-27, 34-38, 40
Y A	Shields D. et al., Efficient cleavage and segregation of nascent presecretory proteins in a reticulocyte lysate supplemented with microsomal membranes, <i>J. Biol. Chem.</i> , 1978, Vol.253, No.11, pages 3753-6	1-4, 9-23, 28-39 5-8, 24-27, 40
Y A	Walter P. et al., Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro- assembled polysomes synthesizing secretory protein, <i>J. Cell. Biol.</i> , 1981, Vol.91(2 Pt 1) pages 545-50	1-4, 9-23, 28-39 5-8, 24-27, 40
Y A	JP 2000-175695 A (The Institute of Physical and Chemical Research), 27 June, 2000 (27.06.00), Full text & EP 1143009 A1	1-4, 15-23, 34-39 5-14, 24-33, 40 & WO 00/36133 A1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/JP2004/017219**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	JF 62-500631 A (Shilas Corp.), 19 March, 1987 (19.03.87), Full text & WO 86/02381 A1	<u>40</u> 1-39

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2004/017219

**Box No. II      Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 41 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
(See extra sheet.)
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III      Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/017219

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

The substance as set forth in claim 41 is specified as "a protein from which a signal sequence has been cleaved and which is obtained by the protein synthesis method as set forth in claim 1" and, therefore, involves any proteins from which a signal sequence has been cleaved and which is obtained by this synthesis method.

However, nothing is specifically disclosed in the description as a protein from which a signal sequence has been cleaved and which is obtained by this synthesis method. Thus, claim 41 is neither supported by the description nor disclosed therein. Even though the common technical knowledge at the point of the application is considered, it is completely unknown what specific substances are involved in the scope thereof and what are not. Thus, claim 41 is described in an extremely unclear manner.

Such being the case, no meaningful search can be made on the invention as set forth in claim 41.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/017219

The substance as set forth in claim 40 is specified as "an N-glycosylated protein obtained by the protein synthesis method as set forth in claim 1" and, therefore, involves any N-glycosylated proteins obtained by this synthesis method.

However, nothing but TNF protein encoded by the DNA sequence represented by SEQ ID NO:2 is specifically disclosed in the description as an N-glycosylated protein obtained by this synthesis method. Even though the common technical knowledge at the point of the application is considered, the scope of substances obtained by the synthesis method cannot be specified. Thus, claim 40 is described in an unclear manner.

Such being the case, the search was made on the TNF protein encoded by the DNA sequence represented by SEQ ID NO:2 that is specifically disclosed in the description.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 7 C12P21/02, C07K14/00, C12N15/09

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 7 C12P21/02, C07K14/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTplus(JOIS) BIOSIS/WPI(DIALOG) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Gillies S. et al., Translation of vesicular stomatitis and Sindbis virus mRNAs in cell-free extracts of Aedes albopictus cells, J. Biol. Chem., 1981, Vol. 256, No. 24, pages 13188-92	1-4, 9-10, 20-23, 28-29, 39
Y		11-19, 30-38
A		5-8, 24-27, 40

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.01.2005

国際調査報告の発送日

25.1.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N 3126

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き)	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y A	Davis J. W., Cell-free protein synthesizing systems isolated from an insect cell line, Insect Biochem., 1977, Vol. 7, pages 77-83	1-4, 9-23, 28-39 5-8, 24-27, 40
Y A	JP 2003-235598 A (レンゴー株式会社) 2003. 08. 26, 全文 (ファミリーなし)	1-4, 9-14, 20-23, 28-33, 39 5-8, 15-19, 24-27, 34-38, 40
Y A	JP 2003-245094 A (レンゴー株式会社) 2003. 09. 02, 全文 (ファミリーなし)	1-4, 9-14, 20-23, 28-33, 39 5-8, 15-19, 24-27, 34-38, 40
Y A	Fujiwara H. et al., Small RNAs of the silkworm, <i>Bombyx mori</i> as revealed by in vitro capping and in vitro transcription, Comp. Biochem. Physiol. B., 1988, Vol. 91, No. 2, pages 383-8	1-4, 9-14, 20-23, 28-33, 39 5-8, 15-19, 24-27, 34-38, 40
Y A	Sakurai H. et al., In vitro transcription of the plasma protein genes of <i>Bombyx mori</i> , Biochim. Biophys. Acta., 1990, Vol. 1087, No. 1, pages 18-24	1-4, 9-14, 20-23, 28-33, 39 5-8, 15-19, 24-27, 34-38, 40
Y A	Scott M. P., Cell-free protein synthesis in lysates of <i>Drosophila melanogaster</i> cells, Biochemistry, 1979, Vol. 18, No. 8, pages 1588-94	1-4, 9-14, 20-23, 28-33, 39 5-8, 15-19, 24-27, 34-38, 40

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名・及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y A	WO 00/50586 A2 (European Molecular Biology Laboratory) 2000.08.31, 全文 (ファミリーなし)	1-4, 9-14, 20-23, 28-33, 39 5-8, 15-19, 24-27, 34-38, 40
Y A	Shields D. et al., Efficient cleavage and segregation of nascent presecretory proteins in a reticulocyte lysate supplemented with microsomal membranes, J. Biol. Chem., 1978, Vol. 253, No. 11, pages 3753-6	1-4, 9-23, 28-39 5-8, 24-27, 40
Y A	Walter P. et al., Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein, J. Cell. Biol., 1981, Vol. 91(2 Pt 1) pages 545-50	1-4, 9-23, 28-39 5-8, 24-27, 40
Y A	JP 2000-175695 A (理化学研究所) 2000.06.27, 全文 & EP 1143009 A1 & WO 00/36133 A1	1-4, 15-23, 34-39 5-14, 24-33, 40
X A	JP 62-500631 A (シタス コーポレイション) 1987.03.19, 全文 & WO 86/02381 A1	40 1-39

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2.  請求の範囲 41 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

（特別ページ参照）

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

(第1ページ第II欄2. より続く)

請求の範囲41に記載の物質は、「請求の範囲第1項に記載のタンパク質合成方法によつて得られた、シグナル配列が切除されたタンパク質」と特定されており、当該合成方法で得られる、シグナル配列が切除されたあらゆるタンパク質を包含するものである。

しかしながら、明細書には、当該合成方法で得られる、シグナル配列が切除されたタンパク質として具体的なものが一切記載されていないから、請求の範囲41は、明細書による裏付けを欠き、開示も欠いている。また、出願時の技術常識を勘案しても、具体的にどのような物質が包含され、どのような物質が包含されないのかが全く不明であつて、請求の範囲41の記載は著しく不明確である。

したがつて、請求の範囲41に記載された発明について有意義な調査をすることができない。

請求の範囲40に記載の物質は、「請求の範囲第1項に記載のタンパク質合成方法によつて得られた、N-グリコシル化されたタンパク質」と特定されており、当該合成方法で得られる、N-グリコシル化されたあらゆるタンパク質を包含するものである。

しかしながら、当該合成方法で得られる、N-グリコシル化されたタンパク質として、明細書に具体的に開示されているものは、配列番号2に示されたDNA配列がコードするTNFタンパク質のみである。また、出願時の技術常識を勘案しても、当該合成方法で得られる物質の範囲を特定できないから、請求の範囲40の記載は不明確である。

したがつて調査は、明細書に具体的に記載されている、配列番号2に示されたDNA配列がコードするTNFタンパク質について行った。